

THESIS

MARBURG

1965

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. F. Hartmann

Präzipitierende Eigenschaften von Transaminasen-Antikörpern

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

vorgelegt von

Barbara Hoeffgen

aus Heinersdorf Kreis Neiße

Marburg 1965

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. F. Hartmann

Präzipitierende Eigenschaften von Transaminasen-Antikörpern

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Barbara Hoeffgen

aus Heinersdorf Kreis Neiße

Marburg 1965

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 4.2.1965
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. H. Hensel

Referent: Prof. Dr. med. N. Lang

Correferent: Prof. Dr. med. F. Hartmann

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Einleitung und Fragestellung</u>	1
B. <u>Methodik</u>	
1. Immunisierungstechnik und Serumgewinnung	4
a) Erstimmunisierung	4
b) Nachimmunisierung	4
c) Serumgewinnung	5
2. Gammaglobulin-Isolierung	5
3. Verwendete Puffer	6
4. Herstellung von Organhomogenaten	6
5. Eiweißbestimmung	6
6. Einengung von Seren und Extrakten	7
7. Jodierung von Enzymen und Serumproteinen	7
8. Agarbereitung	8
9. Nachweis der Antikörperbindung	8
a) Ouchterlony-Teste	8
b) Immunelektrophorese	9
c) Heidelberger-Teste	11
10. Fototechnik	12
C. <u>Ergebnisse</u>	
I. <u>Immunpräzipitation von Transaminasen</u>	13
1. Enzymspezifität	13
a) im Ouchterlony-Test	13
b) in der Immunelektrophorese	15
c) in der Überwanderungselektrophorese	16
2. Organ- und Speziespezifität; Immunpräzipitation von Transaminasen aus Organextrakten verschiedener Spezies	18
a) Immunpräzipitation von Schweineorgan-Transaminasen	18
b) Immunpräzipitation von Humanorgan-Transaminasen	24
c) Immunpräzipitation von Rattenorgan-Transaminasen	25
d) Immunpräzipitation von Meerschweinchenorgan-Transaminasen	26
e) Keine Präzipitation von Kaninchenorgan-Transaminasen	28
f) Organspezifität der Transaminasen-Antikörper	30

	Seite
3. Kreuzreaktionen und Kopräzipitationen der Transaminasen mit Serumproteinen	31
a) Einseitige immunologische Kreuzreaktion der Schweineherz-GPT mit Human-Gammaglobulin	32
b) Kopräzipitation der Transaminasen mit Serumproteinen	35
c) Kopräzipitation von Humanserumproteinen untereinander	37
4. Immunpräzipitation der Transaminasen nach Absorption der Antikörper	42
5. Immunpräzipitation bei variabler Antigen-Antikörper-Relation	44
II. <u>Einfluß von Alterung und Hitzeeinwirkung auf die Präzipitationseigenschaften der Antiseren, Enzyme und Extrakte</u>	48
1. Alterung	48
2. Hitzeeinwirkung	48
III. <u>Einfluß der Transaminasen auf die Immunpräzipitation von Serumproteinen</u>	50
1. Transaminasenzusatz zum Antigen	50
a) Transaminasenzusatz zu Kaninchenserum	50
b) Transaminasenzusatz zu Humanserum	51
2. Transaminasenzusatz zum Antikörper	52
a) Transaminasenzusatz zu Anti-Kaninchenserum von der Ziege	52
b) Transaminasenzusatz zu Anti-Humanserum	52
IV. <u>Immunpräzipitation von Transaminasen in vitro (Heidelberger-Teste) - Versuch einer quantitativen Erfassung löslicher und präzipitieren-der Antigen-Antikörper-Komplexe</u>	54
1. Variation des Antikörper-Angebotes bei konstantem Antigen-Angebot	54
a) Versuche mit GOT und GOT-Antiserum	54
b) Versuche mit GPT und GPT-Antiserum	54
c) Versuche mit Hepatitisserum und GPT-Antiserum	55
2. Variation des Antigen-Angebotes bei konstantem Antikörper-Angebot	56
D. <u>Allgemeine Diskussion</u>	60
E. <u>Zusammenfassung</u>	76
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	78
Lebenslauf	86

A. Einleitung und Fragestellung

Es war Aufgabe dieser Arbeit, die präzipitierenden Eigenschaften von Antikörpern gegen gereinigte Schweineherz-Transaminasen zu untersuchen. Insbesondere interessierte, wie weit sich die Präzipitation in Spezies- und Organspezifität parallel zur bereits untersuchten Immunhemmung (32, 33a, 38) verhalten würde und wie weit Unterschiede bestünden. Es interessierte weiter, ob durch die Präzipitation eine Antikörperbildung gegen Begleitproteine erkennbar wäre.

Aus der Vielzahl der bisher in der Literatur beschriebenen, experimentell erzeugten, teils enzymaktivitätshemmenden, teils präzipitierenden Enzym-Antikörper seien nur einige Beispiele genannt:

Schon 1930 beschrieb J.H.NORTHROP (45) Antikörper gegen Schweinepepsin, die auch Rinder- und Meerschweinchenpepsin präzipitierten. Diese Ergebnisse wurden 1937 durch C.V.SEA-STONE und R.M.HERRIOT (57) bestätigt. Auch R. ARNON und G.E.PERLMANN (2) und H. VAN VUNAKIS und L.LEVINE (65) erzeugten Antikörper gegen Schweinepepsin und -pepsinogen, die in den Versuchen aller Autoren untereinander, bei VAN VUNAKIS und LEVINE auch mit Human- und Pferdepepsin und -pepsinogen kreuzreagierten.

1931/32 erhielten J.S.KIRK und J.B.SUMNER (27) nach Immunisierung von Kaninchen hemmende Antikörper gegen Urease aus einer Bohnensorte. 1937 stellte J.B.SUMNER (61) außerdem präzipitierende Antikörper fest, die Sojabohnen gegenüber eine Kreuzreaktion zeigten.

1939 immunisierten D.H.CAMPBELL und L.FOURT (6) Kaninchen mit Rinderleber-Katalase und fanden präzipitierende Antikörper gegen dieses Enzym. Auch wurden Pferde- und Hundeleber-Katalase durch Antikörper gegen Rinderleber-Katalase präzipitiert. Zwar hatten L.STERN und F.BATELLI (60) schon 1929 eine Hemmung der Katalase-Aktivität beschrieben. Dabei handelte es sich jedoch nicht um experimentell erzeug-

te Antikörper, sondern um solche, die normalerweise in verschiedenen Tiergeweben vorkommen.

In den folgenden Jahren wurden Antikörper gegen zahlreiche andere Enzyme erzeugt, so gegen Papain (19,51), Trypsin (23), Tyrosinase (1), das reduzierende Gärungsferment (30), d-Ribonuclease (58, 59), Pankreas- und Streptokokken-Desoxyribonuclease (7, 8, 20), Lipase (53), Lecithinase (10, 71), d-Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (29, 69), Amylase (14, 15, 34), Alkoholdehydrogenase (42), Laktatdehydrogenase (LDH) verschiedener Spezies (18, 25, 36, 41, 43, 44), Elastase (24), Phosphohexose-Isomerase (43), Carbamylphosphat-Synthetase (35), Penicillinase (49), Adenylsäure-Desaminase, Kreatinkinase und Kreatin-ATP-Transphosphorylase (52), Tryptophan-Synthetase (62, 69, 70), Xanthinoxidase (63), alkalische Phosphatase (3, 13), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (5, 37), Proteinase und Diphospho-Pyridin-Nucleotidase (20), Tyrosin- α -Keto-Glutarat-Transaminase (26) und schließlich gegen β -Galactosidase (11).

Aus diesen Beispielen ist die Anti-Urease von J.S.KIRK und J.B.SUMNER (27) der einzige Enzym-Antikörper, der nicht präzipitiert, sondern nur eine hemmende Wirkung hat. Bei den Antikörpern gegen Katalase (6), alkalische Phosphatase (3, 13), β -Galactosidase (11) und Pepsin (45, 57) handelt es sich nur um präzipitierende Antikörper ohne Hemmwirkung. Alle anderen genannten Anti-Enzyme, auch das Anti-Pepsin und -Pepsinogen von R.ARNON und G.E.PERLMANN (2) und von H.VAN VUNAKIS und L.LEVINE (65) - im Gegensatz zu J.H.NORTROP (45) und C.V.SEASTONE und R.M.HERRIOT (57) - haben sowohl präzipitierende wie hemmende Eigenschaften.

Nur K.F.GREGORY und F.WRÓBLEWSKI (18) beschreiben in ihren Versuchen mit Anti-Kaninchenmuskel-LDH noch einen Anstieg der Präzipitation, während die Hemmung des Antiserums bereits wieder abnahm. V.A.NAJJAR und J.FISHER (42) erklären diesen Unterschied dadurch, daß gleich nach der Immunisierung hemmende Antikörper entstehen, die sich mit dem injizierten Antigen zu einem Komplex verbinden. Nun sollen Antikörper gegen diesen Komplex entstehen, die aber das En-

zym nicht mehr hemmen, sondern nur noch präzipitieren können. In Hyperimmunseren sollen ebenfalls nur oder fast nur präzipitierende Antikörper enthalten sein (49). Im allgemeinen gehen Hemmung und Präzipitation der Antikörper parallel.

B. Methodik

=====

1. Immunisierungstechnik und Serumgewinnung

a) Erstimmunisierung

Wir immunisierten sechs Kaninchen (Tier 1 - 6) mit Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und neun (Tier 7 - 15) mit Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)* aus Schweineherz; je 2 mg Enzymprotein waren in 1 ml einer 0,1-molaren Ammoniumsulfatlösung gelöst. GOT hatte eine Aktivität von 180 000 mU/mg, GPT von 18 000 mU/mg (gereinigte Enzyme der Fa. Boehringer). Den Tieren wurde 0,1 ml des unverdünnten Enzyms unter Zusatz von 0,4 ml Aluminiumhydroxyd-Gel (Freund's Adjuvans) und 0,1 ml Penicillin intraperitoneal injiziert, dasselbe noch zweimal wöchentlich über drei Wochen. Der Zusatz von Adjuvans soll nach P.GRABAR (17) die Antikörperbildung steigern.

b) Nachimmunisierung

Die Tiere 1 - 4 und 6 - 15 wurden nach ca. drei Monaten nachimmunisiert, indem wir ihnen 0,1 ml gereinigtes Enzym ohne weitere Zusätze intravenös injizierten. Bei einigen dieser Tiere wurde später die Nachimmunisierung noch einmal wiederholt. Bei vier GOT-immunisierten Tieren wurde die zweite Nachimmunisierung mit Schweineherz-Fraktionen durchgeführt, die durch Elektrophorese von Schweineherzextrakt im Agar von den anderen Fraktionen getrennt und durch nachfolgende Elution gewonnen worden waren (s. C II, 2a). Dazu wurde der Agar mit den Fraktionen ausgeschnitten, zerkleinert und 48 Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung eluiert. Danach wurde 20 Minuten bei 4500 g zentrifugiert. Vom Überstand injizierten wir 0,5 ml intravenös.

* / Wenn wir im folgenden von GOT sprechen, ist stets die cytoplasmatische GOT gemeint.

Vier Tiere starben während der Versuchsreihe (zwei GOT-Tiere und zwei GPT-Tiere), eines ca. drei Monate nach der Erstimmunisierung, zwei etwa nach ebenso langer Zeit nach der ersten, eines etwa eine Woche nach der zweiten Nachimmunisierung. Bei dem letzten Tier wurde eine Pyelonephritis nachgewiesen.

c) Serumgewinnung

Vor der Immunisierung sowie sechs und zwölf Tage nach der Erst- und Nachimmunisierung wurde den Tieren aus der Ohrvene Blut entnommen. Durch Zentrifugieren gewannen wir die Seren. Zur Erhöhung der Haltbarkeit wurde 0,01 mg Natriumazid pro ml Serum zugesetzt, was ohne Einfluß auf die Antikörper-Eigenschaften der Seren war.

Die Messung der Enzymaktivitätshemmung durch die Antiseren (32, 33a, 38) zeigte, daß der Gehalt an enzymaktivitätshemmenden Antikörpern nach der letzten Immunisierung bis etwa zum 12. Tag anstieg und ca. drei Wochen erhalten blieb. Die Antikörperbildung der einzelnen Tiere war sehr unterschiedlich. Das Serum der Tiere 10 und 11 z.B. enthielt bereits nach der ersten Nachimmunisierung nur noch sehr wenig oder keine präzipitierenden Antikörper; auch die Enzymaktivitätshemmung durch das Antiserum dieser Tiere war nur sehr gering. Die Seren der übrigen Tiere dagegen zeigten auch nach mehrfacher Nachimmunisierung Antikörper mit sehr guter Hemmwirkung und Präzipitation.

2. Gammaglobulin-Isolierung

Für die meisten Versuche verwendeten wir die Gesamtseren. Lediglich für die Jodierung (s. B 7) isolierten wir die Gammaglobuline. Pro ml Antiserum wurde 1 ml physiologische Kochsalzlösung (pH 7,4) zugesetzt, danach tropfenweise unter ständigem Rühren 1,5 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung. Das Gemisch blieb zwölf Stunden bei 4° C stehen und wurde dann zwanzig Minuten bei 4500 g zentrifugiert. Das

Sediment wurde mit 43%iger Ammoniumsulfatlösung (5 ml/ml Antiserum) aufgenommen und dreißig Minuten bei 4500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Sediment wurde in 1,5 ml gepufferter Kochsalzlösung (0,9 g NaCl/100 ml Phosphatpuffer pH 7,4) gelöst und 48 Stunden lang gegen den gleichen Puffer dialysiert.

3. Verwendete Puffer

Für die Herstellung des Agars (s. B 8) und für die Immunelektrophorese (s. B 9b) wurde - wie von A.J.CROWLE (12), P.GRABAR (17) und J.J.SCHEIDEGGER (54) empfohlen - Michaelis-Puffer mit pH 8,2 und einer Ionenstärke von 0,05 benutzt, für die Herstellung von Organhomogenaten (s. B 4) und zur Dialyse von Eiweißlösungen Phosphatpuffer pH 7,4.

4. Herstellung von Organhomogenaten

Wir verwendeten Humanorgane aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg, die durchschnittlich 12 - 24 Stunden post mortem entnommen wurden, sowie lebensfrische Organe von Schweinen, Meerschweinchen, Ratten und Kaninchen.

Zunächst wurden die Organe so weit wie möglich von Fettgewebe befreit. Pro g Gewebe wurden dann 5 ml Phosphatpuffer (pH 7,4) zugesetzt. Wir homogenisierten eisgekühlt mit dem Ultra-Turax (Fa. Janke & Kunkel KG.) dreimal eine halbe Minute lang bei Stufe 8 - 9. Das Homogenat wurde zwanzig Minuten bei 6000 g zentrifugiert und der Überstand für die Versuche benutzt. Die Extrakte wurden nach Zusatz von Natriumazid (0,01 %) bei -20° C aufbewahrt.

5. Eiweißbestimmung in Seren und Extrakten

Der Eiweißgehalt der Seren und Extrakte wurde nach der Biuret-Methode bestimmt, außerdem mit einer Elektrophorese-

streifen-Amidoschwarz-Färbemethode (0,5 g/100 ml Methanol-Eisessig 9 : 1), um die Organextrakte der verschiedenen Spezies auf etwa gleichen Eiweißgehalt einstellen zu können. Je 10 μ l von vier bis fünf verschiedenen Extrakten wurden auf einem Elektrophoresestreifen aufgetragen. Nach Trocknung bei 100° C wurden die Streifen mit Amidoschwarz gefärbt und mit dem Lösungsmittel entfärbt. Mit dem Zeiss-Integralschreiber wurde die Planimeterfläche bestimmt und jeweils die Farbfläche der gleichen Extrakte von verschiedenen Spezies miteinander verglichen. War z.B. die Farbfläche von Schweineleberextrakt doppelt so groß wie die von Humanleberextrakt, so wurde entweder der Schweineleberextrakt auf das doppelte Volumen verdünnt oder der Humanleberextrakt auf die Hälfte eingeeengt (s. B 6).

6. Eingeung von Seren und Extrakten

Gelegentlich wurden Antiseren und Organextrakte auf ein Drittel bis ein Fünftel des Ausgangsvolumens eingeeengt. Sie wurden dazu in Dialyseschläuchen in Silica-Gel (Fa. Riedel-de Haën AG.) gelegt, das zuvor auf 400° C erhitzt und wieder abgekühlt worden war.

7. Jodierung von Enzymen und Serumproteinen

Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde für einige Versuche das Antigen (Enzym) bzw. der Antikörper (Kaninchenserum) mit dem radioaktiven Jod-Isotop J^{131} markiert.

Wir jodierten die fünffach mit Aqua dest. verdünnten Enzyme, die Gammaglobuline der Anti- und Kontrollseren sowie für weitere Kontrollversuche einige isolierte Humanserumproteine nach dem Verfahren von A.G.WORMALL und Mitarbeitern (68).

Nachdem Menge und Eiweißgehalt der zu jodierenden Fraktionen bestimmt waren, wurden sie in Dialyseschläuche gefüllt

und mit Ammoniak ($3 \mu\text{l}/\text{mg}$ Protein) versetzt. J^{131} wurde in Form von J_2KJ zugegeben. Wir ließen die jodierten Eiweißlösungen 48 Stunden lang bei 4°C gegen Phosphatpuffer (pH 7,4) unter Magnet-Rührer dialysieren, um das überschüssige, nicht gebundene J_2 zu entfernen, wobei der Puffer je nach noch vorhandenem, nicht-proteingebundenem Jod zwei- bis dreimal erneuert wurde. Nach der Dialyse zentrifugierten wir die Fraktionen zur Entfernung eventueller Ausfällungen zehn Minuten lang bei 5000 g und bestimmten die Radioaktivität mit dem Szintillationszähler.

8. Agarbereitung

Nach P.GRABAR (17) wurden 1,5 g Reinagar (Behringwerke Marburg) mit 100 ml Michaelispuffer (pH 8,2) versetzt und im Wasserbad bei 100°C unter gelegentlichem Umrühren verflüssigt. Nach völliger Auflösung des Agars wurden 0,01 - 0,02 % Natriumazid zur Verhinderung einer bakteriellen Zersetzung und 0,0125 % Cadmiumnitrat zur Verbesserung der Präzipitate zugefügt. Der heiße, flüssige Agar wurde nun in angewärmten Zentrifugengläsern zehn Minuten lang bei ca. 5000 g zentrifugiert und danach sofort in Petrischalen (für Ouchterlony-Teste, s. B 9a) oder auf Objektträger (für die Immunelektrophorese, s. B 9b) gegossen.

9. Nachweis der Antigen- und Antikörperbindung

Die Antigen- und Antikörperbindung wurde in Agar-Präzipitationstesten und durch radioaktive Markierung von Antigen oder Antikörper im Heidelberger-Test nachgewiesen.

a) Ouchterlony-Teste

Diese Untersuchungsmethode wurde von Ö.OUCHTERLONY in zahlreichen Arbeiten beschrieben (z.B. 46, 47, 48). Wir benutzten Petrischalen von 9 cm Durchmesser, die mit 12 ml Agar gefüllt wurden, oder - für orientierende Versuche -

Objektträger mit 3 ml Agar (Ouchterlony-Technik als Mikro-Testverfahren). Nach dem Erkalten des Agars wurden nach folgendem Schema Löcher gestanzt:

	1
Wir konnten so gleichzeitig	6. M .2
das Verhalten von sechs ver-	5. .3
schiedenen Antiseren gegen-	.
über einem in der Mitte ein-	4

gefüllten Antigen oder umgekehrt untersuchen.

In jedes Loch wurden 0,03 - 0,05 ml eingefüllt. In einigen Versuchen war dem Antiserum Meerschweinchen-Komplement zugesetzt worden. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied gegenüber Versuchen, die unter gleichen Bedingungen, aber ohne Komplementzusatz durchgeführt wurden.

Ein feuchtes Filterpapier, das in den Deckel der Petrischale gelegt wurde, verhinderte das Austrocknen des Agars. Kam es dennoch einmal vor, daß eine Platte etwas austrocknete, so wurden die sich bildenden, störenden, festen Bestandteile in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Die verschiedenen Antiseren reagierten mit dem gleichen Antigen etwas unterschiedlich; einige Linien wurden 3 - 5 Tage nach der Einfüllung sichtbar, andere erst nach 8 - 10 Tagen. Danach wurde der Agar zwei Tage lang in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um noch vorhandenes, nicht gebundenes Eiweiß herauszulösen. Die Kochsalzlösung wurde dabei ein- bis zweimal erneuert. Danach wurde der Agar bei Zimmertemperatur getrocknet und meistens anschließend zwei Minuten mit Amidoschwarz 10 B (0,5 g pro 100 ml Methanol-Eisessig 9 : 1) gefärbt und mehrfach mit dem Lösungsmittel entfärbt. Die Färbung konnte auch dem Trocknen vorausgehen, jedoch mußte dann eine halbe Stunde gefärbt und mehrere Stunden entfärbt werden. Nach A.J.CROWLE (12) und P.GRABAR (17) ist diese Färbung für Kaninchen-Antikörper am besten geeignet.

b) Immunelektrophorese

Dieses Verfahren wurde zuerst von P.GRABAR und C.A. WILLIAMS (16) beschrieben. Wir wandten für unsere Versu-

che das Mikroverfahren nach J.J.SCHEIDEGGER (54) an. Meist benutzten wir Objektträger der Maße 76 x 26 mm (3 ml Agar), gelegentlich auch Objektträger mit doppelter Breite (6 ml Agar); der Lochabstand und damit der Diffusionsweg waren dabei doppelt so groß. Sie ermöglichten auch die Auftragung einer größeren Menge Antigen.

Nach dem Schema 1)

oder 2)



wurden zunächst nur die Löcher gestanzt, in die im allgemeinen das Antigen, nur selten das Antiserum, eingefüllt wurde. Sechs bis sieben Objektträger wurden gleichzeitig in die mit Michaelispuffer (pH 8,2) gefüllte Elektrophoresekammer gebracht, bei der rechts die Kathode, links die Anode war. Die Elektrophorese wurde eineinhalb bis zwei Stunden bei 45 Volt durchgeführt. Bei höherer Spannung wurde der Agar zu heiß, so daß er an den Rändern schmolz und eintrocknete, oder es bildeten sich graue Niederschläge, die die Präzipitation zwar nicht verhinderten, aber das Erkennen der Linien erschwerten oder unmöglich machten. Die Niederschläge wurden bei einer Proteinfärbung nicht mitgefärbt.

Nach der Elektrophorese wurde(n) die Rume(n) gezogen und mit Antiserum gefüllt. Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Bereits nach einem Tag waren die meisten Präzipitate entstanden, einige erst nach zwei oder drei Tagen. Die Objektträger wurden danach zwei Tage in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und dann, mit feuchtem Filterpapier bedeckt, getrocknet.

Die Färbung erfolgte hier immer nach dem Trocknen, im allgemeinen mit Amidoschwarz wie unter 9a) beschrieben, gelegentlich auch mit Azocarmin (0,5%ig). Zur Unterscheidung der Lipoproteide von den übrigen Proteinen wurde einmal eine Doppelfärbung durchgeführt, wie sie von G.SCHWICK (56) beschrieben wurde: Die Lipoidfärbung erfolgte zwei Stunden lang in Ölrot (0,5 % Farbstoff in 50%igem Äthanol gelöst),

die Entfärbung mit dem Lösungsmittel. Die Proteinfärbung schloß sich unmittelbar an, und zwar eine Stunde in Lichtgrün (0,5 % in 30%iger Trichloressigsäure gelöst). Entfärbt wurde wiederum mit dem Lösungsmittel.

c) Heidelberger-Teste

Um quantitative Aussagen machen zu können, variierten wir das Antigen- und Antikörper-Angebot.

In einer Serie wurde das Antigen verdünnt. In jedes Reagenzglas kam die gleiche Menge Antiserum, dazu das Antigen, von Röhrchen zu Röhrchen in abnehmender Menge (näheres s. C IV). Zuletzt wurden alle Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung wieder auf die gleiche Menge aufgefüllt. Das erste Reagenzglas enthielt keine, das letzte die größte Menge Kochsalzlösung. In Parallelversuchen wurde das Antikörper-Globulin verdünnt, während die Antigenmenge konstant blieb. Zu jeder Reihe gehörten ein bis zwei Kontrollröhrchen, die statt des Antiserums Serum von nicht immunisierten Tieren enthielten.

Alle Röhrchen wurden 30 Minuten bei 37° C inkubiert und blieben für 12 - 14 Stunden im Kühlschrank bei 4° C stehen. Danach wurde der Grad der Trübung in den einzelnen Röhrchen festgestellt und verglichen.

Hatten wir radioaktiv markierte Proteine benutzt (s. B 7), wurde zunächst die Radioaktivität des gesamten Ansatzes bestimmt. Danach wurden alle Röhrchen 15 Minuten bei 5000 g zentrifugiert, die Sedimente mit 3 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und nochmals abzentrifugiert (wie oben); Überstand und Waschflüssigkeit wurden verworfen, das Sediment wurde mit 3 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Jetzt wurde die Sediment-Radioaktivität bestimmt und aus der Differenz zwischen dieser und der Aktivität im Gesamtansatz die prozentuelle Antigen- oder Antikörperbindung im Sediment errechnet. Im Überstand wurde durch N.LANG und S.MASSARRAT (33a,38) die noch vorhandene Enzymaktivität bestimmt.

Wir bestimmten den Eiweißgehalt des Sedimentes, indem wir nochmals zentrifugierten (wie oben), die Sedimente jetzt in 0,2 ml Kochsalzlösung aufnahmen und damit eine Doppelbestimmung nach der Biuretmethode vornahmen.

10. Fototechnik

Die Aufnahmen wurden mit der Leica bei Blende 8 auf Agepe-Film gemacht. Als Durchleuchtungsquelle diente ein Lichtkasten. Die Ouchterlony-Teste wurden in frischem Zustand mit einer Belichtungszeit von 3 und 5 Sekunden fotografiert. Die Petrischalen wurden dazu etwa 20 cm vom Lichtkasten entfernt auf eine Glasplatte gestellt. Der Lichtkasten wurde unter der Petrischale mit schwarzem Papier abgedeckt, so daß das Licht nur von der Seite her auf die Agarplatte fiel. Auf diese Weise wurde die bestmögliche Darstellung der Linien erreicht.

Die Objektträger dagegen wurden nach dem Trocknen und Färben unmittelbar auf den Lichtkasten gelegt und im durchfallenden Licht bei einer Belichtungszeit von einer halben oder einer Sekunde aufgenommen.

Die Filme wurden in Rodinal entwickelt und die Papierabzüge in Reprogenentwickler. Die günstigste Belichtungs- und Entwicklungszeit für die Abzüge mußte jeweils ermittelt werden.

Anmerkung zur Reproduktion der Abbildungen:

Schwache Präzipitatlinien, deren Wiedergabe bei der mehrfachen Fotoreproduktion in Frage gestellt schien, wurden vor dem Fotodruck mit Tusche nachgezogen. Es handelt sich um die Abbildungen 1, 4, 8, 10, 13, 28, 30, 31, 32.

C. Ergebnisse

I. Immunpräzipitation von Transaminasen

1. Enzymspezifität

a) Enzymspezifität im Ouchterlony-Test

Bei der Diffusion von gereinigten Enzymen gegen verschiedene Antiseren entstanden im Ouchterlony-Test zwi-

schen GOT und dem gegen sie gerichteten Antiserum bis zu drei Präzipitatlinien (Abb. 1a und b), ohne daß wir bisher feststellen konnten, welche dieser Linien dem Enzymprotein entsprach.

GPT dagegen wurde von ihrem Antiserum in fast allen Versuchen nur in einer Linie präzipitiert (Abb. 1c und d); nur einmal waren zwei Linien entstanden.

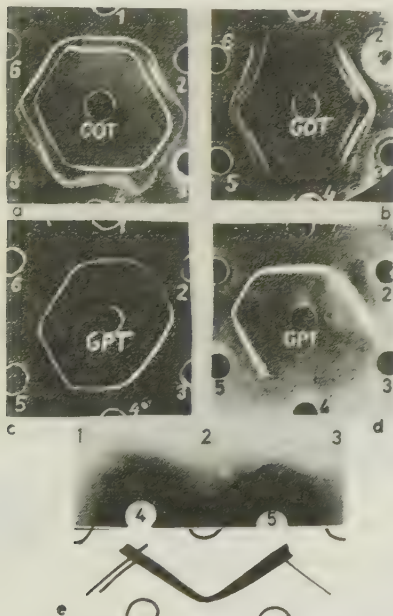


Abb. 1: Präzipitation von gereinigten Transaminasen im Ouchterlony-Test

- a und b: Präzipitation von GOT durch GOT-Antiseren.
a: 1 - 3: verschiedene, auf etwa ein Drittel des Ausgangsvolumens eingedampfte GOT-Antiseren; 4 - 6: die gleichen GOT-Antiseren vor Eindampfung (4 = 1, 5 = 2, 6 = 3).
b: 1 und 4: verschiedene Kaninchenserum; 2, 3, 5 und 6: Antiseren der gleichen Tiere. 6 (Loch 2 und 5) bzw. 13 (Loch 3 und 6) Tage nach der letzten Immunisierung gewonnen.
c und d: Präzipitation von GPT durch GPT-Antiseren.
c: 1 - 3: verschiedene, auf etwa ein Drittel des Ausgangsvolumens eingedampfte GPT-Antiseren; 4 - 6: die gleichen Antiseren vor Eindampfung.
d: 1 und 2: GPT-Antiseren, 11 (Loch 1) bzw. 6 (2) Tage nach der letzten Immunisierung gewonnen; 3 = Kaninchenserum des gleichen Tieres vor Immunisierung. 4 = anderes Kaninchenserum; 5 und 6: GPT-Antiseren dieses Tieres, 6 (5) bzw. 11 (6) Tage nach der letzten Immunisierung gewonnen.
e: oben das Originalfoto, unten eine Skizze desselben. 1 und 3: GOT, 2: GPT, 4 und 5: Gemisch aus GOT- und GPT-Antiserum.

	Präzipitation in			Zahl der Versuche
	1	2	3 Linien	
GOT + GOT-Antiserum	6 x	15 x	6 x	27
GPT + GPT-Antiserum	22 x	1 x		23

Tab.1: Präzipitation von gereinigten Schweineherz-Transaminasen im Ouchterlony-Test bei Diffusion von 0,05 ml Antiserum gegen 3600 mU GOT bzw. 360 mU GPT = 0,02 mg Enzymprotein

Die GOT-Linien überkreuzten die GPT-Linien (Abb.1e). GPT-Antiserum präzipitierte nie GOT und umgekehrt. Die Enzyme wurden also nur von dem gegen sie gerichteten Antikörper präzipitiert. Wir ließen auch andere Enzyme gegen die GOT- und GPT-Antiseren diffundieren. Es war nie eine Präzipitation festzustellen (Abb.2a). Unsere Transaminasen-Antikörper waren also, soweit untersucht, enzyspezifisch.

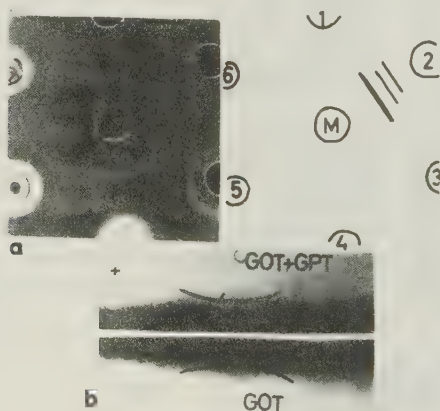


Abb.2: Enzyspezifität der Transaminasenantikörper

- a: im Ouchterlony-Test; links das Originalfoto, rechts eine Skizze;
M = GPT-Antiserum, 1 = GOT, 2 = GPT, 3 = Malat-Dehydrogenase, 4 = Laktat-Dehydrogenase, 5 = Aldolase, 6 = Glutamat-Dehydrogenase.
b: in der Immunoelektrophoresis;
oben: GOT und GPT, unten: nur GOT, Mitte: GOT-Antiserum.

	GOT-Antiserum	GPT-Antiserum
GOT	+	-
GPT	-	+
Glutamat-Dehydrogenase	-	-
Aldolase	-	-
Malat-Dehydrogenase	-	-
Laktat-Dehydrogenase	-	-

Tab.2: Enzymspezifität der Transaminasen-Antikörper im Ouchterlony-Test und in der Immunelektrophorese (+ = Präzipitation)

b) Enzymspezifität in der Immunelektrophorese

Bei der Immunelektrophorese des gereinigten Enzyms und nachfolgender Diffusion gegen das Antiserum entstand sowohl zwischen GOT und GOT-Antiserum als auch zwischen GPT und GPT-Antiserum nur eine Linie (Abb.3a und b). GPT verhielt sich hier also genau so wie im Ouchterlony-Test, GOT dagegen zeigte ein abweichendes Verhalten.

Die GOT-Linie lag bei parallelgelaufener Immunelektrophorese von Serum im Alpha₂-Globulinbereich, die GPT-Linie im Betaglobulinbereich (Abb.3c und d).

Bei gemeinsamer Elektrophorese von gereinigter GOT und GPT und nachfolgender seitlicher Diffusion gegen ein GOT-Antiserum entstand ebenfalls wie bei der Elektrophorese von GOT allein nur die GOT-Linie (Abb.2b). Auch hier wurden die Transaminasen also nur vom korrespondierenden Antiserum präzipitiert. Ebenso gab es in der Immunelektrophorese keine Präzipitation nicht transaminierender Enzyme durch die Transaminasen-Antikörper.

Die Ergebnisse stimmten mit de-

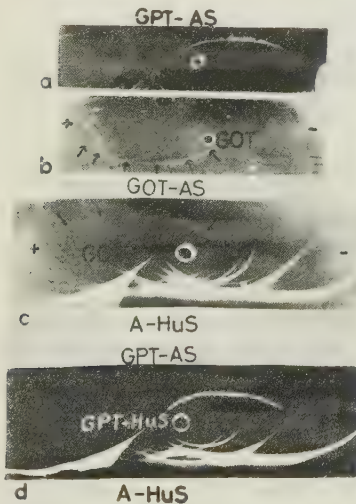


Abb.3: Präzipitation von gereinigten Transaminasen in der Immunelektrophorese

- a: oben: GPT-Antiserum, Mitte: GPT
b: Mitte: GOT, unten: GOT-Antiserum
c: Mitte: GOT in Humanserum, oben: GOT-Antiserum, unten: Anti-Humanserum
d: Mitte: GPT in Humanserum, oben: GPT-Antiserum, unten Anti-Humanserum

nen im Ouchterlony-Test überein (Tab.2).

c) Enzymspezifität in der Überwanderungselektrophorese

Bei der Überwanderungselektrophorese nach N. LANG (31) ließen wir im Agar radioaktiv markiertes Enzym über Antiserum wandern und danach von der "oberen" Rinne her das gleiche Antiserum, von der "unteren" her das Enzym entgegendiffundieren (Abb.4a, untere Teil-Abb.). Es entstand die gewohnte GOT-Linie zwischen dem elektrophoretisch aufgetrennten Enzym und dem entgegendiffundierenden Antiserum

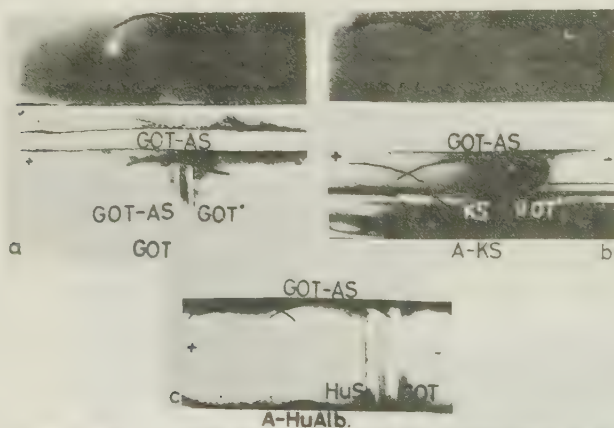


Abb.4: Präzipitation von gereinigter GOT in der Überwanderungselektrophorese in Agar

- a: Wanderung von GOT über GOT-Antiserum; oben die Autoradiographie, unten die Färbung. GOT' = J^{131} -markierte GOT.
- b: Wanderung von GOT über Kontrollserum; oben wieder die Autoradiographie, unten die Färbung. A-KS = Anti-Kaninchenserum von der Ziege.
- c: Wanderung von GOT über Humenserum; A-HuAlb. = Anti-Human-Albumin.

und außerdem ein deutliches Präzipitat zwischen den beiden Querrinnen, in denen das J^{131} -markierte Enzym bzw. das Antiserum aufgetragen worden war. Das elektrophoretisch aufgetrennte Antiserum dagegen präzipitierte das von unten entgegendiffundierende Enzym nicht mehr. Von den während der Überwanderungselektrophorese entstandenen GOT-Komponenten wurde die schneller wandernde Komponente durch die Antikörper aus der Querrinne abgefangen und bildete das Präzipitat zwischen den beiden Querrinnen. Dabei wurden offensichtlich

auch die Antikörper gebunden, die in der einfachen Immunelektrophorese mit der langsam wandernden GOT-Komponente reagiert hätten; denn das überwanderte Antiserum präzipitierte bei der späteren Diffusion gegen das aus der unteren Längsrinne diffundierende Enzym auch nicht dessen "langsame" Komponente. Die langsamer wandernde GOT-Komponente des elektrophoretisch aufgetrennten Enzyms dagegen wurde an der üblichen Stelle, nämlich im Alpha_2 -Globulinbereich, von dem Antiserum aus der oberen Längsrinne präzipitiert. Die Linien waren auch in der Autoradiographie deutlich sichtbar (Abb.4a, obere Teil-Abb.), ein Beweis, daß sie aus Enzym und Antikörper bestanden.

Ließen wir nun GOT über ein Serum eines nicht immunisierten Tieres, d.h. über Kontrollserum (KS) wandern und anschließend gegen ein Antiserum diffundieren, entstanden zwei Linien statt einer, eine im Alpha_1 -, die zweite im Alpha_2 -Globulinbereich (Abb.4b, untere Teil-Abb.). Die " Alpha_1 -Linie"⁺⁾ war in der Autoradiographie, der nach A.J.CROWLE (12) empfindlichsten Nachweismethode für Präzipitate, sogar stärker als die " Alpha_2 -Linie" abgebildet (Abb.4b, obere Teil-Abb.). Das gleiche Ergebnis fanden wir auch bei Überwanderung von GOT über Humanserum (Abb.4c) sowie bei gemeinsamer Elektrophorese von GOT und KS. Zwischen den Querrinnen war in all diesen Versuchen kein Präzipitat sichtbar. Hier wurde also die schnell wandernde GQT-Komponente während der Überwanderung nicht beeinflusst, so daß sie bis in den Alpha_1 -Globulinbereich gelangen konnte und hier von dem aus der oberen Längsrinne entgegendiffundierenden Antiserum präzipitiert wurde. Ihre Präzipitationslinie überkreuzte die der langsameren Komponente.

Bei der Überwanderung eines Nichtimmunserums(KS) durch GPT und nachfolgender seitlicher Antikörper-Diffusion zeigte sich kein Unterschied zur Überwanderung eines Antiserums mit GPT (Abb.5).

+) Mit der Bezeichnung soll nur die Lokalisation in diesem Proteinbereich, nicht aber eine Identität mit dem entsprechenden Protein ausgedrückt werden.

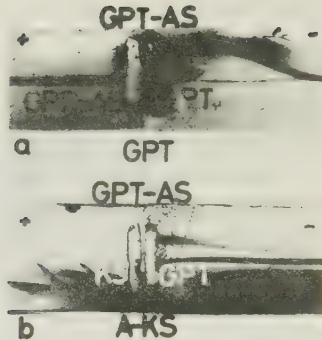


Abb.5: Präzipitation von gereinigter GPT in der Überwanderungselektrophorese

- a: Wanderung von GPT über GPT-Antiserum
 b: Wanderung von GPT über Kontrollserum
 A-KS = Anti-Kaninchenserum

2. Spezies- und Organspezifität

a) Immunpräzipitation von Schweineorgan-Transaminasen

Bei der Diffusion von Schweineorganextrakten gegen Antiserum entstanden im Ouchterlony-Test sowohl mit GOT-Antiserum als auch mit GPT-Antiserum bis zu drei Linien, unterschiedlich bei den einzelnen Antiseren und Extrakten (Abb.6). Bei der GOT aus dem Extrakt entstanden dabei ebenso viele

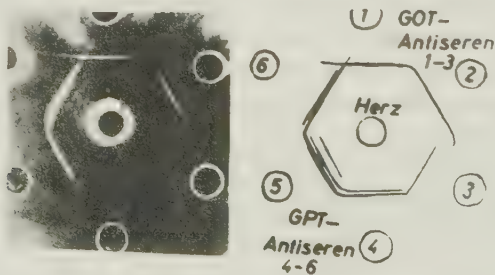


Abb.6: Präzipitation von Schweineorganextrakt-Transaminasen im Ouchterlony-Test
 links aus Originalfoto, rechts eine Skizze.
 Mitte: Schweineherzextrakt

Linien wie bei der Präzipitation des gereinigten Enzyms (s. C I 1a). Die gereinigte GPT verhielt sich in der Zahl der auftretenden Linien anders (nur eine Linie) als die GPT aus Schweineorganextrakt (bis zu drei Linien). Wenn jedoch bei GPT-Antiserum nur eine Linie entstand, war diese identisch mit der Linie zwischen gereinigtem Enzym und Antiserum.

Die Linien zwischen Schweineorganextrakt und GOT-Antiserum überkreuzten die Linien zwischen Schweineorganextrakt und GPT-Antiserum, zeigten also keine Antigenverwandtschaft an.

	1	Präzipitation in			Zahl der
		2	3 Linien	neg.	Versuche
GOT-Antiserum	28 x	10 x	12 x	6 x	56
GPT-Antiserum	23 x	15 x	4 x	8 x	50

Tab.3: Präzipitation von Schweineorganextrakt-Transaminasen im Ouchterlony-Test bei Diffusion von 0,05 ml Antiserum gegen 0,05 ml 20%igen Extrakt

Eine schnell diffundierende Antigenkomponente der gereinigten GOT (Abb.7, Loch 6) war antigengemäß identisch mit einer langsam diffundierenden der Extrakt-GOT (Abb.7, Loch 5).

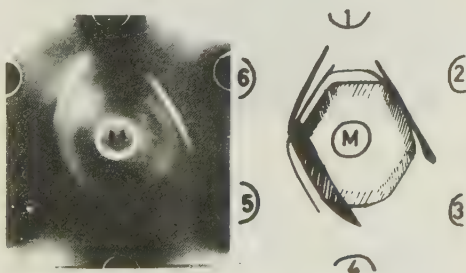


Abb. 7 : Präzipitation von Humenorganextrakt-GOT im Ouchterlony-Test im Vergleich mit der Präzipitation von Schweineorganextrakt- und gereinigter GOT

Links das Originalfoto, rechts eine Skizze; M = GOT-Antiserum, 1 = Humenherzextrakt, 2 = Humenherzextrakt und gereinigte GOT, 3 = Humenleberextrakt, 4 = Humenherzextrakt, 5 = Schweineherzextrakt, 6 = gereinigte GOT

Wurde der Extrakt in der Immunelektrophorese aufgetrennt, zeigte sich dagegen keine Übereinstimmung beim Vergleich mit dem Verhalten der gereinigten GOT!

Bei Diffusion des Schweineorganextraktes gegen GOT-Antiserum waren im Gegensatz zur Beobachtung einer Linie bei gereinigtem Enzym (s. C I 1b) in der Regel zwei Linien vorhanden, eine längere im α_1 -Globulinbereich (I), eine kürzere im Betaglobulinbereich (III), dagegen nicht diejenige, die mit gereinigter GOT im α_2 -Globulinbereich (II) entstand (Abb.8a). Nach gemeinsamer Elektrophorese von Schweineorganextrakt und gereinigter GOT und Diffusion gegen das Antiserum war außer den beiden oben beschriebenen "Schweineorgan-Linien" auch die " α_2 -Linie"^{+) des gereinigten Enzyms zu erkennen.}

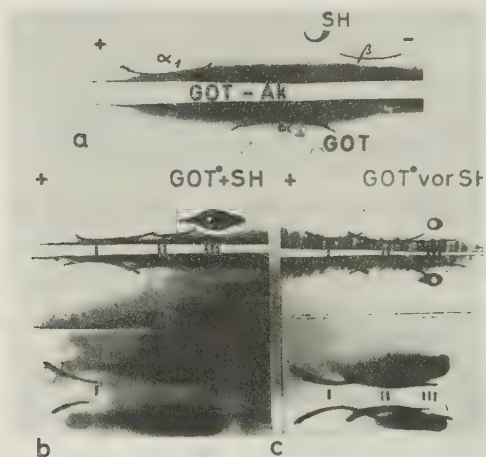


Abb.8: Präzipitation von Schweineherzextrakt-GOT in der Immunelektrophorese

- a: oben: Schweineherzextrakt, unten: gereinigte GOT, Mitte: GOT-Antiserum
- b: gemeinsame Elektrophorese von GOT* und Schweineherzextrakt; obere Hälfte: Färbung, untere Hälfte: Autoradiographie; GOT* = J⁵¹-markierte GOT
- c: Elektrophorese von GOT* vor Schweineherzextrakt; oben: Färbung, unten: Autoradiographie

Die Linien I und II überkreuzten sich bei optimalen Versuchsbedingungen, wie Abb.8b und c (obere Hälfte) zeigt; beide Antigene I und II zeigen also keine immunologische Verwandtschaftsreaktion. Daß das Antiserum gegen die hochgereinigte GOT zugleich Antikörper gegen das im α_1 -Bereich wandernde

^{+) siehe die Fußnote auf Seite 17!}

de Antigen I und das im Betaglobulinbereich wandernde Antigen III enthält, könnte darauf beruhen, daß diese Antigene dem hochgereinigten Enzym noch in Spuren beigemischt waren.

Die radioaktive Markierung der gereinigten GOT mit J^{131} zeigte eine starke Radioaktivität der Linie II und daneben nur eine Spur der radioaktiven Fraktionen I und III (Autoradiographie in der unteren Hälfte der Abb.8b). Ließen wir aber, wie der Versuch in der Abb.8c zeigt, die Hälfte der radioaktiven GOT elektrophoretisch v o r wandern und trugen die andere Hälfte zusammen mit dem Gewebsextrakt eine halbe bis eine Stunde später auf, so änderte sich durch die fraktionierte Wanderung die Verteilung der radioaktiven GOT-Fraktion II, die jetzt fast gleich stark in den Präzipitaten I und II vertreten war; offensichtlich war jetzt e i n Antigen in zwei sich überkreuzenden (!) Linien vorhanden, aber nur bei Präzipitation im Organextrakt, bei Präzipitation ohne diesen vollständig in Linie II. Der Teil des Antigens II, der durch den Kunstgriff der zweizeitigen Elektrophorese in den Bereich des immunologisch nicht verwandten Antigens I gebracht wurde, lagerte sich während der Diffusion stark genug an das Organ-Antigen an, um mit ihm zu kopräzipitieren, obwohl die Affinität zwischen I und II andererseits zu gering ist, um die Trennung beider Antigene unter der normalen Agarelektrophorese zu verhindern.

Eines von neun GOT-Antiseren (AS 15) präzipitierte Schweineorganextrakte nur in der "Beta-Linie"⁺⁾ , hatte aber trotzdem eine gute Hemmwirkung (32, 33a, 38).

In einigen Versuchen wurden drei Linien festgestellt, wobei die dritte dann im α_2 -Globulinbereich lag.

1	Präzipitation in		negativ	Zahl der Versuche
	2	3 Linien		
4 x	37 x	6 x	8 x	55

Tab.4: Präzipitation von Schweineorganextrakt-GOT in der Immunelektrophorese

⁺⁾ siehe die Fußnote auf Seite 17!

Alpha ₁ -	Alpha ₂ -	Linien im Betaglobulinbereich	Zahl der Versuche
		+	4 x
+		+	34 x
	+	+	3 x
(+)	+	+	6 x

Tab.5: Lage der Präzipitationslinien der Schweineorganextrakt-GOT in der Immunelektrophorese

Bei Diffusion des Extraktes gegen GPT-Antiserum entstand stets nur eine Linie im Betaglobulinbereich, analog zur Präzipitation der gereinigten GPT durch ihr Antiserum im Ouchterlony-Test und in der Immunelektrophorese. Auch bei gemeinsamer Elektrophorese von Schweineorganextrakt und gereinigter GPT und anschließender Diffusion gegen das Antiserum entstand nur eine Linie (Abb.9). Das im Schweineorgan-

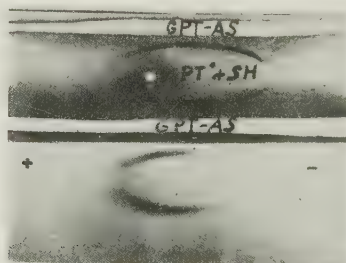


Abb.9: Präzipitation von Schweineherzextrakt-GPT in der Immunelektrophorese

Obere Hälfte: Färbung, untere Hälfte: Autoradiographie.
Färbung: oben und unten GPT-Antiserum, Mitte: J^{131} -markierte GPT (GPT*) und Schweineherzextrakt.

extrakt mit GPT-Antiserum reagierende Antigen war also mit der hochgereinigten GPT identisch; dagegen zeigte es keine Antigenverwandtschaft zu einer der beiden Komponenten der Schweineorganextrakt-GOT.

Durch fraktioniertes Zentrifugieren der Organ-Homogenate versuchten wir, die "Mitochondrienfraktion" aus Schweineherzextrakt zu isolieren, d.h. die bei 6000 g erhaltene Fraktion, die nach Verwerfen der 1300 g - Fraktion eine

Mitochondrienanreicherung darstellt. Ließ man diese nach Aufnahme in Phosphatpuffer (pH 7,4) statt der gesamten Schweineorganextrakte gegen die GOT-Antiseren diffundieren, entstanden keine Präzipitationslinien.

Auch wurde die GOT-Enzymaktivität der Mitochondrienfraktion durch die Antiseren nicht gehemmt (33a, 38).

Es war also anzunehmen, daß die Antikörper nur gegen die GOT des Cytoplasmas gerichtet waren.

Ferner wurden Untersuchungen mit Seren der Tiere angestellt, denen bei der zweiten Nachimmunisierung Schweineherz-Teilfraktionen injiziert worden waren (s. B 1b). Nach elektrophoretischer Auftrennung von Schweineorganextrakt und nachfolgender Diffusion gegen das Antiserum eines Tieres, das mit der vorderen = "Alpha₁"-Fraktion nachimmunisiert worden war, entstand entweder nur die "Alpha₁-Linie", oder sie war wesentlich stärker als die "Beta-Linie". Umgekehrt fand sich eine stärkere "Beta-Linie" und eine schwache oder keine "Alpha₁-Linie", wenn wir das Antiserum eines mit der "Beta"-Fraktion nachimmunisierten Tieres entgegendiffundieren ließen (Abb.10).

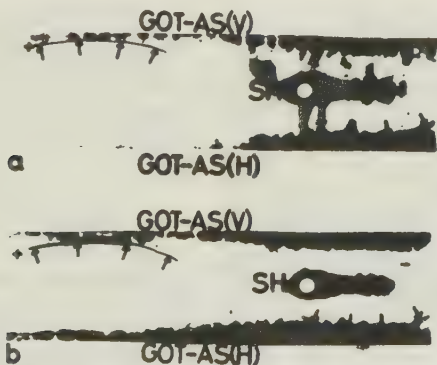


Abb.10: Präzipitation von Schweineherzextraktfraktionen

- a: oben: GOT-Antiserum eines Kaninchens, das nur mit der vorderen Fraktion nachimmunisiert wurde; unten: GOT-Antiserum eines Kaninchens, das nur mit der hinteren Fraktion nachimmunisiert wurde; Mitte: Schweineherzextrakt.
b: dasselbe mit Antiseren anderer Versuchstiere

b) Immunpräzipitation von Humanorgan-Transaminasen

Auch bei der Diffusion von 20%igen Humanorganextrakten gegen die Antiseren entstanden im Ouchterlony-Test gelegentlich schwache Präzipitationslinien, die nach Einengung der Extrakte auf ein Drittel bis ein Fünftel des Ausgangsvolumens (s. B6) etwas deutlicher wurden (Abb.7, Loch 1 und Abb.12a, Loch 1). GOT-wie GPT-Antiseren präzipitierten Humanorganextrakt-Transaminasen nur in einer Linie. Humanorgan-GOT schien mit einer schnell diffundierenden Komponente der gereinigten und einer langsam diffundierenden der Schweineorganextrakt-GOT identisch zu sein (Abb.12a, Loch 1, 2 und 6). Mehr als die Hälfte aller Versuche war negativ; der größte Anteil davon entfiel auf die Versuche mit GPT-Antiserum.

GOT-Antiserum		GPT-Antiserum		Zahl der Versuche	davon	
+	-	+	-		+	-
39	23	12	42	116	51	65

Tab.6: Präzipitation von Humanorganextrakt-Transaminasen im Ouchterlony-Test bei diffusion von 0,05 ml Antiserum gegen 0,05 ml 20%ig angesetzten und dann auf 1/3 des Ausgangsvolumens eingengten Extrakt

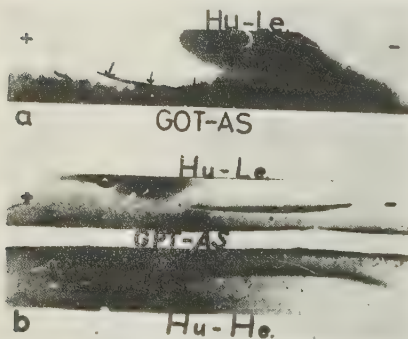


Abb.11: Präzipitation von Humanorganextrakt-Transaminasen in der Immunelektrophorese

- a: Präzipitation von Humanorganextrakt-GOT; oben: Humanleberextrakt, unten: GOT-Antiserum
b: Präzipitation von Humanorganextrakt-GPT; oben: Humanleberextrakt, unten: Humanherzextrakt, mitte: GPT-Antiserum

In der Mikromethode der Im-munelektrophorese dagegen ergaben auch eingengte Humanorganextrakte nur selten ein Präzipitat. Lediglich ein GOT-Antiserum (AS 12) präzipitierte Humanleberextrakt in einer Linie, die im Alpha₂-Globulinbereich lag (Abb.11a).

Die GPT-Antiseren präzipitierten im Gegensatz dazu und abweichend von den Ergebnissen im Ouchterlony-Test Humanorgan-Transaminasen häufiger. Die Linie entstand - wie alle GPT-Linien - im Betaglobulinbereich (Abb.11b).

GOT-Antiserum		GPT-Antiserum		Zahl der Versuche	davon	
+	-	+	-		+	-
3	36	15	14	68	18	50

Tab.7: Präzipitation von Humanorganextrakt-Transaminasen in der Immunelektrophorese

Präzipitation	GOT-Antiserum	GPT-Antiserum
im Ouchterlony-Test	+	(+)
in der Immunelektrophorese	(+)	+
elektrophoretische Wanderung im	α_2 -Globulinbereich	β -Globulinbereich

Tab.8: Präzipitation von Humanorganextrakt-Transaminasen; Vergleich der Ergebnisse im Ouchterlony-Test und in der Immunelektrophorese

Mit beiden Methoden untersuchten wir auch die Präzipitation der Transaminasen in Humanseren. Selbst bei hohem Transaminasengehalt (Hepatitisserum) und nach starker Einengung solcher Seren gab es weder im Ouchterlony-Test noch in der Immunelektrophorese eine Präzipitation. Dagegen gelang es, im Heidelberger-Test eine Präzipitation sichtbar zu machen (s. C IV).

Die untersuchten Humanseren hatten vor der Einengung eine Enzymaktivität von 200 - 600 mU/ml für jede der beiden Transaminasen. Die Humanorganextrakte hatten eine durchschnittliche GOT-Aktivität von 300 - 500 mU/ mg Protein und eine durchschnittliche GPT-Aktivität von 50 - 100 mU/ mg Protein (38). Der Eiweißgehalt der Extrakte betrug rund 2 mg%.

c) Immunpräzipitation von Rattenorgan-Transaminasen

Auch Rattenorganextrakt-Transaminasen wurden im Ouchterlony-Test gelegentlich durch die Antiseren präzipitiert (s. Tab.9 und Abb.12a, Loch 4).

Präzipitation	GOT-Antiserum		GPT-Antiserum		Zahl der Versuche
	+	-	+	-	
im Ouchterlony-Test	9	8	1	16	34
in der Immunelektrophorese	3	5	2	4	14

insgesamt +: 15, -: 33

Tab.9: Präzipitation von Rattenorganextrakt-Transaminasen in Ouchterlony-Test und Immunelektrophorese

Nach elektrophoretischer Auftrennung der 20%igen Rattenorganextrakte und nachfolgender Diffusion gegen Antiseren entstand nur selten ein Präzipitat. Bei Diffusion gegen GOT-Antiserum entstand eine kleine Linie im Beta-Globulinbereich (Abb.12b oben), also anders als bei der gereinigten GOT und

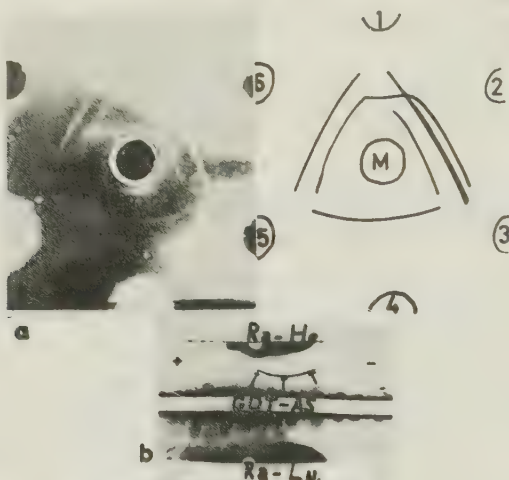


Abb.12: Präzipitation von Organextrakt-GOT verschiedener Spezies

- a: Präzipitation von Rattenorganextrakt-GOT im Ouchterlony-Test im Vergleich mit der Präzipitation von gereinigter GOT und Organextrakt-GOT anderer Spezies; M = GOT-Antiserum, 1 = Humanherzextrakt, 2 = Schweineherzextrakt, 3 = Meerschweinchenherzextrakt, 4 = Rattenherzextrakt, 5 = Kaninchenherzextrakt, 6 = gereinigte GOT. Rechts: Skizze
b: Präzipitation von Rattenorganextrakt-GOT in der Immunelektrophorese; oben: Rattenherzextrakt, unten: Rattenlungenextrakt, Mitte: GOT-Antiserum

bei Humanorgan-GOT, wo die Linie im Alpha_2 -Globulinbereich lag und anders als bei Schweineorgan-GOT, die in zwei Linien präzipitiert wurde.

Bei Diffusion gegen GPT-Antiserum entstand eine Linie im Bereich aller bisherigen GPT-Linien, nämlich im Beta-/Globulinbereich.

d) Immunpräzipitation von Meerschweinchenorgan-Transaminasen

Antigene des Meerschweinchenorganextraktes wurden durch GOT- und GPT-Antiseren im Ouchterlony-Test noch seltener

präzipitiert; so entstand nur in zwei von zwölf Versuchen eine Linie zwischen Meerschweinchenorganextrakt und GPT-Antiserum, dagegen präzipitierte GOT-Antiserum die Extrakte nicht.

In der Immunelektrophorese zeigte sich nach Auftrennung der stark eingeeengten Extrakte und Diffusion gegen GOT-Antiserum gelegentlich eine kleine Linie im α_2 -Globulinbereich, also analog zu der Präzipitation der Humanorgane durch GOT-Antiserum (Abb.13).

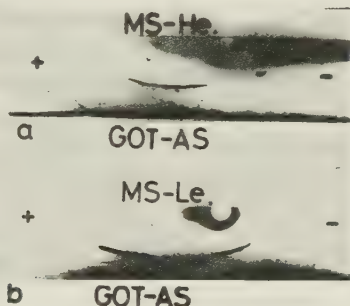


Abb.13: Präzipitation von Meerschweinchenorganextrakt-GOT in der Immunelektrophorese

a: oben: Meerschweinchenherzextrakt, unten: GOT-Antiserum
b: oben: Meerschweinchenleberextrakt, unten: GOT-Antiserum

GPT-Antiserum dagegen präzipitierte die Meerschweinchenorganextrakte in der Immunelektrophorese nicht, also genau umgekehrt wie im Ouchterlony-Test!

Präzipitation	GOT-Antiserum		GPT-Antiserum		Zahl der Versuche
	+	-	+	-	
im Ouchterlony-Test	0	11	2	10	23
in der Immunelektrophorese	4	6	0	9	19
			insgesamt		42
			davon +: 6, -: 36		

Tab.10: Präzipitation von Meerschweinchenorganextrakt-Transaminasen in Ouchterlony-Test und Immunelektrophorese

e) Keine Präzipitation von Kaninchenorgan-Transaminasen

Eine Präzipitation von Kaninchenorganextrakten durch die GOT- oder GPT-Antiseren erfolgte weder im Ouchterlony-Test noch in der Immunelektrophorese, auch nicht nach Einengung der Extrakte (insgesamt 19 Versuche). Auch wurden die Kaninchenorganextrakt-Transaminasen nicht durch die Antiseren gehemmt (38). Die Transaminasen-Antikörper hatten also keine Autoantikörper-Eigenschaft.

Ein Vergleich der verschiedenen Antigen-Antikörper-Reaktionen im Ouchterlony-Test ergab, daß bei gereinigter GOT sowie bei beiden Transaminasen im Schweineorganextrakt mehrere Linien auftraten, während die Transaminasen aus Human-, Ratten- und Meerschweinchenorganen - wenn überhaupt - nur in einer Linie präzipitiert wurden (Abb.14).

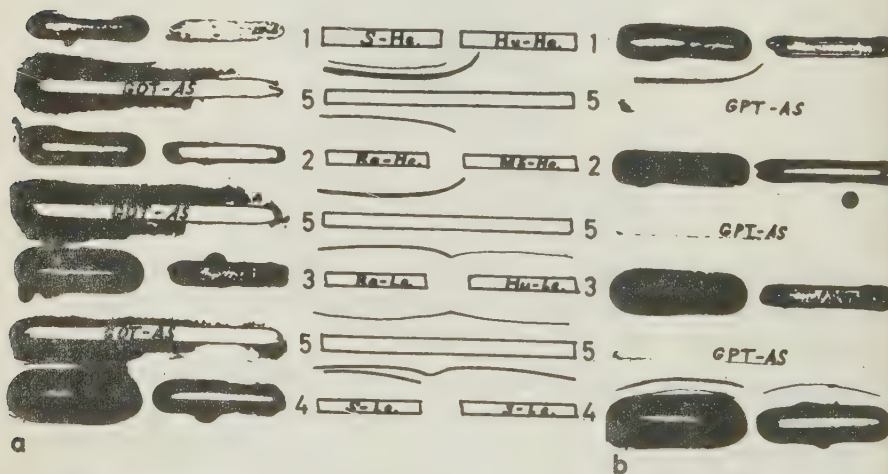


Abb.14: Speziespezifität im Ouchterlony-Test

- a: Präzipitation von Organextrakt-GOT verschiedener Spezies; links das Originalfoto, rechts davon eine Skizze. 1 = Schweineherzextrakt - Humanherzextrakt, 2 = Rattenherzextrakt - Meerschweinchenherzextrakt, 3 = Rattenleberextrakt - Humanleberextrakt, 4 = Schweineleberextrakt in zwei verschiedenen Konzentrationen, 5 = GOT-Antiserum.
b: Präzipitation von Organextrakt-GPT verschiedener Spezies; 1 - 4: wie unter a) angegeben (siehe Skizze in der Mitte der Abb.). 5 = GPT-Antiserum.

Antigen	GOT- GPT-Antiserum	Ouchterlony-Test GPT-Antiserum	Immunelektrophorese GOT- GPT-Antiserum	Linienbereich α_1 - α_2 - β - γ -Glob.
GOT	2(3,1)	-	1	+
GPT	-	1	-	+
Schweineorgane	1(2,3)	1(2,3)	2(3,1)	+
Humanorgane	1	(1)	(1)	+
Rattenorgane	1	(1)	1	+
Meerschweinchenorgane	-	(1)	(1)	+
Kaninchenorgane	-	-	-	+
Humanserum (Hepatitisserum)	-	-	-	+

Tab.11: Präzipitation von Transaminasen verschiedener Herkunft; Vergleich der Ergebnisse in Ouchterlony-Test und Immunelektrophorese

(Es ist jeweils die Zahl der Linien angegeben, eingeklammert die seltener beobachtete Zahl; rechts daneben ist ihre immunelektrophoretische Lokalisation eingezeichnet; gestrichelte Linien: traten nicht konstant auf, GPT-Linien: dick gezeichnet.)

In der Immunelektrophorese dagegen entstanden nur zwischen Schweineorganextrakt und GOT-Antiserum mehrere Linien. Die GOT-Linien der einzelnen Antigene traten in verschiedenen Bereichen auf, vom Alpha₁- bis zum Betaglobulinbereich. Dagegen waren alle GPT-Linien an gleicher Stelle zu finden, nämlich im Beta-/Gammaglobulinbereich (s. Tab.11).

Aus Tab.11 geht auch bereits hervor, daß eine relative Speziesspezifität der Transaminasen-Antikörper vorlag. Die Versuche mit Schweineorganen waren in beiden Untersuchungsverfahren bis auf wenige Ausnahmen immer positiv, d.h. sie wurden von beiden Antikörpern in ein bis drei Linien präzipitiert. Im Gegensatz dazu reagierten Human-, Ratten- und Meerschweinchenorgan-Transaminasen bedeutend seltener - wohl bei zufällig höherem Enzymgehalt der Extrakte - mit den Antiseren. Im allgemeinen war erst starke Einengung der Extrakte notwendig, um das Präzipitat überhaupt sichtbar zu machen. Kaninchenorganextrakte wurden nicht präzipitiert.

Organextrakte von	Positive Ergebnisse		insgesamt
	im Ouchterlony-Test	in der Immun- elektrophorese	
Schwein	86,8 % (92 v.106)	85,5 % (47 v.55)	86,2 %
Mensch	43,9 % (51 v.116)	26,5 % (18 v.68)	35,2 %
Ratte	29,5 % (10 v. 34)	35,7 % (5 v.14)	32,7 %
Meerschwein- chen	8,7 % (2 v. 23)	21,0 % (4 v.19)	14,9 %
Kaninchen	0,0 % (0 v. 7)	0,0 % (0 v.12)	0,0 %

Tab.12: Speziesspezifität der Transaminasen-Antikörper in Ouchterlony-Test und Immunelektrophorese

Die "Prozent"-Angaben stellen bei der z.T. geringen Zahl von Einzelversuchen (in Klammern angegeben) nur eine grobe Orientierung über die Häufigkeit positiver Präzipitationen bei verschiedenen Spezies dar.

f) Organspezifität der Transaminasen-Antikörper

Eine Organspezifität der Transaminasen-Antikörper lag nicht vor. In der Präzipitation aller verwendeten Organextrakte (meist aus Herz, Leber, Muskel und Niere, gelegentlich auch aus Lunge, Milz und Pankreas) zeigten sich nämlich kaum Unterschiede (Abb.15). Sie wurden in beiden Untersuchungsmetho-



Abb.15: Organspezifität im Ouchterlony-Test: Präzipitation von verschiedenen Human- und Schweineorgan-extrakt-Transaminasen

Oben das Originalfoto, unten eine Skizze. Obere Reihe: Herz-, Muskel-, Leber-, Nieren-, Lungen-, Pankreas-, Milzextrakt vom Menschen; untere Reihe: die gleichen Extrakte vom Schwein; mittlere Reihe: 1, 3, 5, 7 = GOT-Antiserum, 2, 4, 6, 8 = GPT-Antiserum.

den in annähernd gleicher Weise durch die Antiseren präzipitiert, obwohl die Tiere mit Schweineherz-GOT immunisiert worden waren, und obwohl der Transaminasengehalt der Extrakte, gemessen an der Enzymaktivität, sehr unterschiedlich war.

Die GOT-Aktivität der verschiedenen Organextrakte schwankte zwischen 50 mU/mg Protein (Lunge, Pankreas) und 2000 mU/mg Protein (Herz); die GPT-Aktivität lag zwischen 4 mU/mg Protein (Milz, Lunge) und 200 mU/mg Protein (Leber) (33a, 38).

Kreuzreaktionen und Kopräzipitationen der Transaminasen mit Serumproteinen

Bei den Untersuchungen zur Antigenspezifität stellten wir fest, daß die Enzym-Antikörper sowohl immunologisch als auch nichtimmunologisch mit einigen Humanserumproteinen kopräzipitierten. Mit radioaktiv markierten Enzymen und einer Abwandlung der sonst üblichen Immunelektrophorese-Bedingungen gelang uns der Nachweis der nichtimmunologischen Kopräzipitationen im Agar. Dazu ließen wir das Enzym während der Immunelektrophorese entweder über Humanserum (oder isolierte Proteine) wandern, oder es wurde zusammen mit Humanserum aufgetragen. In einigen Versuchen benutzten wir dabei brei-

te Objektträger (s. B 9b), um mehr Antigen auftragen zu können. Ferner versuchten wir, Humanserumproteine durch die Elektrophorese in Bereiche zu bringen, wo sie üblicherweise nicht liegen. Sie wurden dazu in einigen Versuchen mehr kathodenwärts, in anderen mehr anodenwärts von einem Humanserum aufgetragen. Nach der Elektrophorese ließen wir ein Gemisch aus zwei oder drei Antikörpern gegen verschiedene der gewanderten Proteine diffundieren. Unter dieser Bedingung präzipitierten die Antikörper einerseits die Antigene, gegen die sie speziell gerichtet waren, andererseits kopräzipitierten sie in geringen Mengen einige der Proteine, die infolge der veränderten Elektrophoresebedingungen in ihrem Bereich lagen. Den Beweis dafür lieferte die Autoradiographie nach radioaktiver Markierung der kopräzipitierenden Proteine.

a) Einseitige, immunologische Kreuzreaktion der Schweineherz-GPT mit Human-Gammaglobulin

Antiseren vom Kaninchen gegen Human-Gammaglobulin präzipitierten auch gereinigte Schweineherz-GPT, sowohl im Ouchterlony-Test (Abb.16a, linke Hälfte) als auch in der Immunelektrophorese (Abb.16b). Umgekehrt präzipitierten GPT-Antiseren das Human-Gammaglobulin nicht (Abb.16c); es besteht also eine einseitige Kreuzreaktion!

Auffallend ist die unterschiedliche Präzipitation in Loch 2 und 6 der Abb.16a, obwohl in beiden Löchern die gleiche Menge Anti-Human-Gammaglobulinserum enthalten ist. Auch Loch 4 enthält Anti-Human-Gammaglobulinserum, allerdings in etwas geringerer Menge, da daneben noch andere Antikörper vorhanden sind. Während bei 6) sogar zwei deutliche Linien - wahrscheinlich die GPT- und die Gammalinie - entstanden sind, brechen die Linien bei 2) und 4) nach kurzem Verlauf ab. Es ist anzunehmen, daß in diesem Bereich eine große Menge löslicher Komplexe aus Human-Gammaglobulin (Loch 3) und dessen Antikörper vorhanden ist, die die Präzipitation von GPT durch Anti-Human-Gammaglobulinserum hemmen. Daß es tatsächlich eine GPT-Linie ist, zeigt die radioaktive Markierung der GPT

und die Autoradiographie in der rechten Hälfte der Abb.16a.

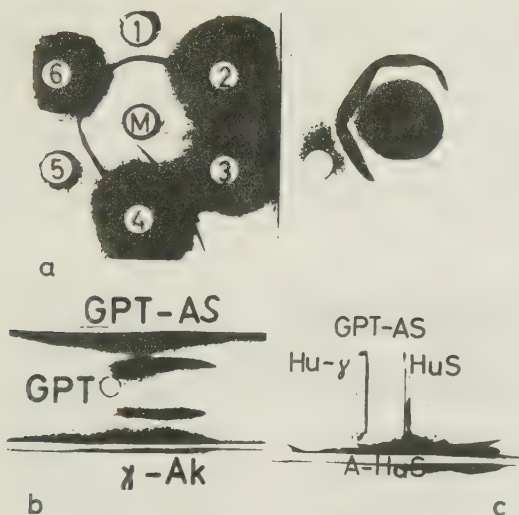


Abb.16: Partielle Kreuzreaktion zwischen GPT und Human-Gammaglobulin

- a: Präzipitation von GPT durch Anti-Human-Gammaglobulin im Ouchterlony-Test; links die Färbung, rechts die Autoradiographie. M = GPT = J^{131} -markierte GPT, 1 und 5 = GPT-Antiserum, 2 und 6 = Anti-Human-Gammaglobulin, 3 = Human-Gammaglobulin, 4 = Anti-Humanserum.
- b: Präzipitation von GPT durch Anti-Human-Gammaglobulin in der Immunelektrophorese; oben: GPT-Antiserum, unten: Anti-Human-Gammaglobulin, Mitte: GPT.
- c: Keine Präzipitation von Human-Gammaglobulin durch GPT-Antiserum; oben: GPT-Antiserum, unten: Anti-Humanserum, Mitte: links = Human-Gammaglobulin, rechts = Humanserum.

Bei gemeinsamer Elektrophorese von GPT und Human-Gammaglobulin und nachfolgender Diffusion gegen Anti-GPT- und Anti-Gammaglobulinserum entstanden die GPT- und die Gammaglobulinlinie (Abb.17a, obere Hälfte). Ließen wir aber GPT zusammen mit Gammaglobulin wandern und dann nur gegen einen Gammaglobulin-Antikörper diffundieren, so wurde das Enzym nicht präzipitiert (Abb.17b), obwohl die Gammaglobulin-Antikörper - wie gezeigt - auch gegen GPT gerichtet waren. Sie waren jetzt aber bereits durch das schneller diffundierende Gammaglobulin (7S-Gamma- und Beta_{2A}-Globulin) abgefangen worden.

Zum Nachweis einer evtl. larvierten Kopräzipitation der GPT in der Gammaglobulinlinie hatten wir die GPT mit J^{131} markiert (Abb.17c); nach Diffusion von J^{131} -GPT und Gammaglobulin gegen beide Antikörper zeigt sich in der Autoradiographie (untere Hälfte der Abb.17c) nur eine radioaktive GPT-Linie, obwohl ein Präzipitat an dieser Stelle färberisch nicht sichtbar war (obere Hälfte der Abb.17c). Trotz der Antigenverwandtschaft resultierte keine GPT-Kopräzipitation in der Gamma-(und Beta_{2A}-)Globulinlinie; es war dort keine Radioaktivität nachzuweisen.

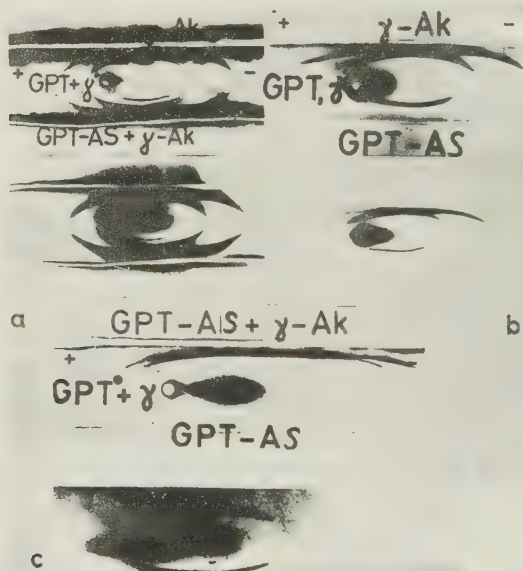


Abb. 17: Präzipitation von GPT und Human-Gammaglobulin nach gemeinsamer Immunelektrophorese durch ihre Antikörper

Oben jeweils die Färbung, unten die Autoradiographie.
 γ -Ak = Anti-Human-Gammaglobulin, GPT-AS = GPT-Antiserum,
 GPT = J^{131} -markierte GPT, γ = J^{131} -markiertes Human-Gammaglobulin

Hatten wir dagegen das Gammaglobulin radioaktiv markiert, zeigte sich nach Diffusion von GPT und J^{131} -Gammaglobulin gegen beide Antikörper auch eine geringe Radioaktivität in der GPT-Linie (Autoradiographie in der unteren Hälfte der Abb.17a und b). Human-Gammaglobulin wurde also von GPT-An-

tiserum zwar nicht präzipitiert, aber nichtimmunologisch kopräzipitiert.

b) Kopräzipitation der Transaminasen mit Serumproteinen

Nach gemeinsamer elektrophoretischer Auftrennung von radioaktiv markierter GOT = GOT* und Humanserum und nachfolgender Diffusion dieses Antigengemisches gegen ein Antikörpergemisch (GOT-Antikörper und Antikörper gegen das Humanserum) war die stärkste Radioaktivität, wie die Autoradiographie in der Mitte der Abb.18a und c zeigt, natürlich in der GOT-Linie nachweisbar; jedoch auch die Human- α_1 L- und - β_1 L-Linie waren radioaktiv. Obwohl GOT mit diesen Proteinen immunologisch nicht verwandt war, kopräzipitierte sie mit ihnen. War das gleiche Antigengemisch aus GOT* und Humanserum nach der Immunelektrophorese dagegen nur gegen Anti-Humanserum diffundiert, so war die Radioaktivität in der Human-Albuminlinie, daneben aber auch geringfügig in der α_2 M-Linie zu finden (Abb.18c). Die α_1 L-Kopräzipitation zeigt

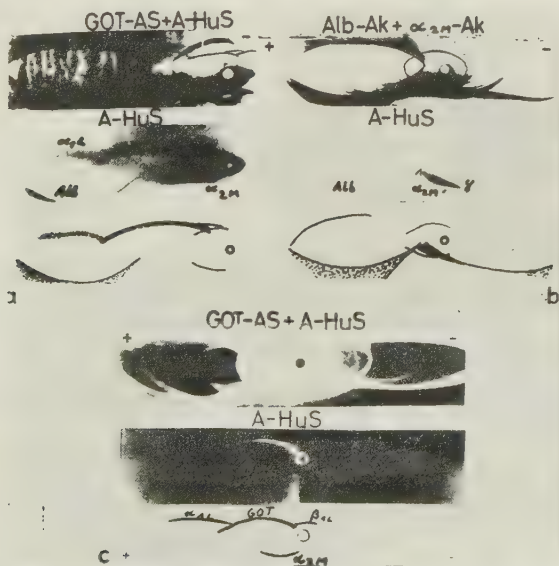


Abb.18: Kopräzipitation von GOT mit Humanserumproteinen
Oben jeweils die Färbung, in der Mitte die Autoradiographie, unten eine Skizze der Autoradiographie: im Mittelloch wurde jeweils 125 I-markierte GOT und Humanserum aufgetragen.
GOT-AS = GOT-Antiserum, A-HuS = Anti-Humanserum, Alb-Ak = Anti-Human-Albumin, α_2 M-Ak = Anti-Human- α_2 -Globulin

te sich auch, wenn GOT* während der Elektrophorese über Humanserum wanderte und danach gegen GOT-Antiserum und Anti-Alpha_{1L}-Proteinserum diffundierte (Abb.19a).

Bei gemeinsamer Elektrophorese von GOT* und Humanserum wurde GOT mit Human-Präalbumin nicht kopräzipitiert. Bei Überwanderung des Humanserums mit GOT* statt gemeinsamer elektrophoretischer Auftrennung von Humanserum und GOT* wurden auch Albumin, Alpha_{2M}-Globulin, Alpha_{2L}-Protein und Transferrin nicht kopräzipitiert (Abb.19b).

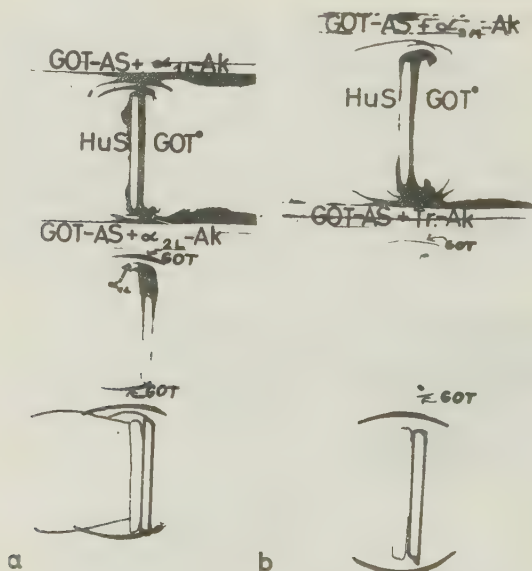


Abb.19: Kopräzipitation von GOT mit Humanserumproteinen in der Überwanderungselektrophorese

Oben: Färbung, Mitte: Autoradiographie, unten: Skizze der Autoradiographie.

GOT* = ³¹P-markierte GOT, HuS = Humanserum, GOT-AS = GOT-Antiserum, α_{1L} -Ak = Anti-Human-Alpha_{1L}-Protein, α_{2L} -Ak = Anti-Human-Alpha_{2L}-Protein, α_{2M} -Ak = Anti-Human-Alpha_{2M}-Globulin, Tr_{2L}-Ak = Anti-Human-Transferrin.

Entsprechende Versuche führten wir mit radioaktiv markierter GPT = GPT* durch. Neben der echten immunologischen Kopräzipitation von GPT und Human-Gammaglobulin (einseitige Kreuzreaktion) fanden wir eine nichtimmunologische Kopräzipitation mit Human-Alpha_{2M}-Globulin, wenn ein Gemisch aus

GPT* und Humanserum nach der Immunelektrophorese gegen ein Antikörpergemisch (GPT-Antiserum und Anti-Humanserum) diffundierte (Abb.20a). Neben der starken GPT-Linie (die übrigens unten genau so stark ist wie oben, obwohl von unten gar kein GPT-Antiserum entgegendiffundierte sondern nur Anti-Humanserum, d.h. Anti-Gammaglobulinserum) hatte sich auf der Autoradiographie auch die Human-Alpha_{2M}-Globulinlinie abgebildet (mittleres und unteres Drittel der Abb.20a).

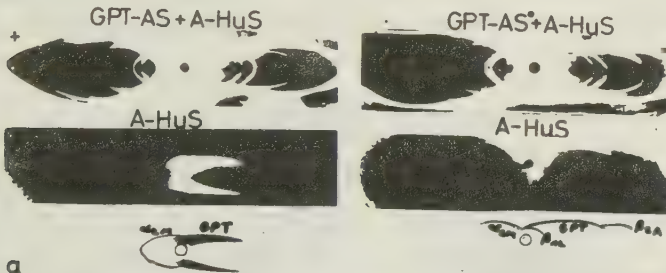


Abb.20: Kopräzipitation von GPT mit Humanserumproteinen

Oben: Färbung, Mitte: Autoradiographie, unten Skizze der Autoradiographie. Im Mittelloch wurde jeweils Humanserum und GPT, die bei b) mit J^{131} markiert war, eingefüllt. GPT-AS = GPT-Antiserum, GPT-AS* = J^{131} -markiertes GPT-Antiserum, A-HuS = Anti-Humanserum.

Hatten wir aber nicht die GPT, sondern das GPT-Antiserum radioaktiv markiert, zeigte sich außer der Alpha_{2M}-Kopräzipitation auch eine Kopräzipitation zwischen GPT und einigen Betaglobulinen (Abb.20b).

In der Überwanderungselektrophorese (GPT* über Humanserum) dagegen wurden Alpha_{2M}-, Beta_{2A}- und Beta_L-Globulin sowie Transferrin mit GPT nicht kopräzipitiert.

c) Kopräzipitation von Humanserumproteinen untereinander

Bei den Untersuchungen zur Kopräzipitation der Transaminasen mit Serumproteinen ergab sich als Nebenbefund, daß auch einige Humanserumproteine untereinander nichtimmunologisch geringfügig kopräzipitierten.

Anti-Präalbuminserum präzipitiert nur Präalbumin, Anti-Albuminserum nur Albumin (Abb.21a). Albumin und Präalbumin sind bekanntlich immunologisch nicht miteinander verwandt.

Hatte man aber, wie Abb.21b zeigt, radioaktiv markiertes Präalbumin = PA* näher der Kathode und ein Humanserum in der Mitte des Objektträgers aufgetragen und nach der Elektrophorese gegen ein Anti-Humanserum (von unten) oder gegen ein Gemisch aus Anti-Albumin- und Anti-Präalbuminserum (von oben) diffundieren lassen, fand sich die Präalbumin-Radioaktivität sowohl in der Präalbumin- als auch in der Albuminlinie, sehr wenig auch in einigen Betaglobulinlinien und in der Gammaglobulinlinie (mittleres und unteres Drittel in der Abb.21b). Unter dieser veränderten Versuchsbedingung hatte also eine, wenn auch geringgradige, Kopräzipitation immunologisch nicht verwandter Proteine stattgefunden.

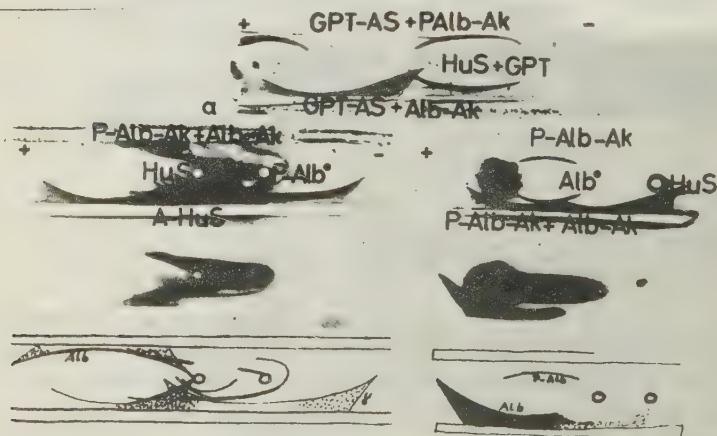


Abb.21: Kopräzipitation von Human-Präalbumin und Human-Albumin

a: Präzipitation von Human-Präalbumin und -Albumin durch ihre homologen Antikörper.

b und c: Kopräzipitation von Human-Präalbumin und -Albumin untereinander und mit anderen Serumproteinen; oben: Färbung, Mitte: Autoradiographie, unten: Skizze der Autoradiographie.

HuS = Humanserum, GPT-Ak = GPT-Antiserum, P-Alb-Ak = anti-Human-Präalbumin, Alb-Ak = Anti-Human-Albumin, A-HuS = Anti-Humanserum, P-Alb* = 131 -markiertes Human-Präalbumin, Alb* = 131 -markiertes Human-Albumin.

In Abb.21c hatten wir Albumin radioaktiv markiert = Alb* und zur Immunelektrophorese mehr anodenwärts eines Humanserums aufgetragen. Nach Diffusion gegen Anti-Präalbuminserum (von oben) entstand in der Färbung nur die Präalbumin-Präzipitation (aus dem Präalbumin des Humanserums und seinem Antikörper); nach Diffusion gegen Anti-Präalbumin- und Anti-Albu-

minserum (von unten) waren färberisch beide Linien erkennbar (oberes Drittel der Abb.21c). In der Autoradiographie (mittleres und unteres Drittel der Abb.21c) zeigte sich jedoch auch die Präalbuminlinie radioaktiv, d.h. Albumin koprizipitierte Präalbumin.

In Abb.22a wurde radioaktiv markiertes Alpha_{2M}-Globulin = α_{2M}^* nahe der Kathode, ein Humanserum in der Mitte des Objektträgers zur Immunelektrophorese aufgetragen. Anschließend ließen wir Anti-Humanserum (von unten) bzw. ein Gemisch aus Anti-Alpha_{2M}- und Anti-Gammaglobulinserum (von oben) entgegen-

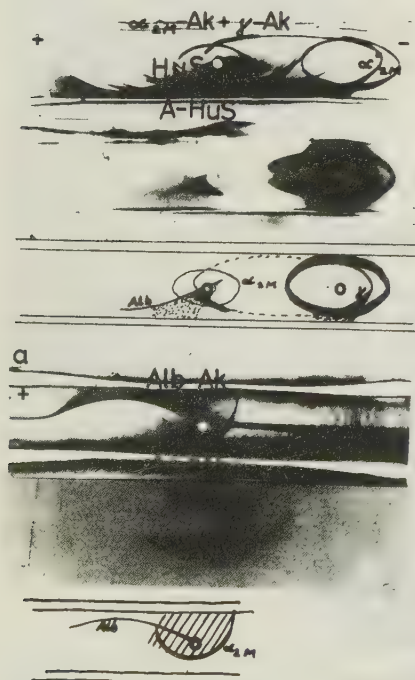


Abb.22: Koprizipitation von Human-Alpha-2-Makro-Globulin mit anderen Serumproteinen

Oben: Färbung, Mitte: Autoradiographie, unten: Skizze der Autoradiographie. Bei b) wurde im Mittelloch Human-Albumin und α_{2M}^* = J¹³¹-markiertes Human-Alpha_{2M}-Globulin aufgetragen.
Alb-Ak = Anti-Human-Albumin, α_{2M}^* -Ak = Anti-Human-Alpha_{2M}-Globulin, γ-AK = Anti-Human-Gammaglobulin, A-HuS = Anti-Humanserum. HuS = Humanserum

gegendiffundieren. Unter dieser Bedingung wurde Gammaglobulin deutlich durch Anti-Alpha_{2M}-Globulinserum koprizipitiert, wie die Autoradiographie im mittleren Drittel der Abb.22a zeigt. Eine leichte Koprizipitation war auch mit Albumin festzustellen. Nach gemeinsamer Immunelektrophorese von α_{2M}^* und Albumin wurde jedes Protein nur von seinem spezifischen Antikörper präzipitiert (oberes Drittel der Abb.22b). In der Autoradiographie (mittleres und unteres Drittel der Abb.22b) ist jedoch auch die Albuminsichel sehr schwach erkennbar. Albumin wurde also auch unter dieser Bedingung mit Alpha_{2M}-Globulin geringfügig koprizipitiert.

Infolge der immunologischen Verwandtschaft präzipitierte J¹³¹-markiertes Gamma-

globulin = γ^* sowohl in der Gammalinie als auch in der Beta_{2M}- und Beta_{2A}-Globulinlinie, wenn es zur Immunelektrophorese anodenwärts von einem Humanserum aufgetragen wurde (Abb. 23a) und anschließend gegen ein Anti-Humanserum (von unten) bzw. ein Gemisch aus Anti-Gamma-, Anti-Beta_{2M}- und Anti-Beta_{2A}-Globulinserum (von oben) diffundierte. Alle drei Globulinlinien hatten sich auch in der Autoradiographie (mittleres und unteres Drittel der Abb. 23a) abgebildet. Daneben waren auf dem Original der Autoradiographie aber noch viele andere Linien geringgradig radioaktiv, wurden also nichtimmunologisch koppräzipitiert, selbst die Albuminlinie; sie waren aber photographisch nicht darstellbar (s. die Skizze im unteren Drittel der Abb. 23a). Nach gemeinsamer Elektrophorese von γ^* mit Humanserum und anschließender Diffusion gegen Anti-Humanserum (Abb. 23b) wurde Beta_{2A}-Globulin ebenfalls

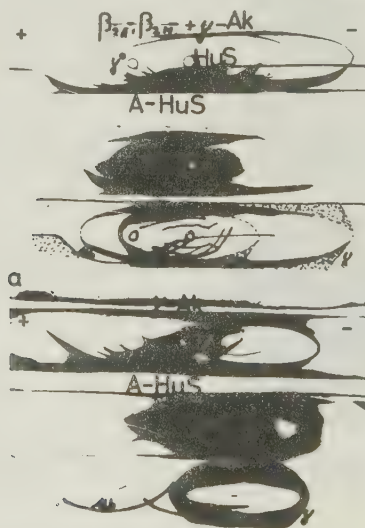
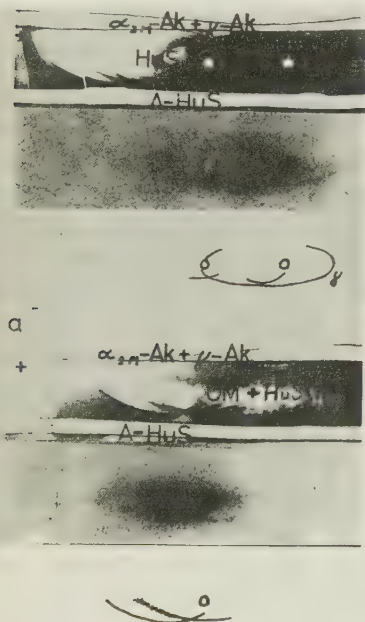


Abb. 23: Koppräzipitation von Human-Gammaglobulin mit anderen Serumproteinen
 Oben: Färbung, Mitte: Autoradiographie, unten: Skizze der Autoradiographie; bei b) wurde im Mittelloch = γ^* -markiertes Human-Gammaglobulin und Humanserum aufgetragen.
 2A-Ak = Anti-Human-Beta_{2A}-Globulin,
 2M-Ak = Anti-Human-Beta_{2M}-Globulin,
 Ak = Anti-Human-Gammaglobulin,
 A-HuS = Anti-Humanserum, HuS = Humanserum.

präzipitiert und kopräzipitiert. Auch die Albumin- und Alpha_{2M}-Linie enthielten einen Teil der Radioaktivität, waren also kopräzipitiert worden.

Schließlich untersuchten wir noch J¹³¹-markiertes Orosomukoid = OM*. Es zeigte eine leichte Kopräzipitation mit Gamma- und einem Betaglobulin, wenn es zur Elektrophorese kathodenwärts von einem Humanserum aufgetragen wurde (Abb.24a)

und anschließend gegen Anti-Humanserum diffundierte. Hatten wir aber OM* gemeinsam mit Humanserum in der Mitte des Objektträgers zur Elektrophorese aufgetragen und anschließend gegen Anti-Humanserum diffundieren lassen, entstanden vier Präzipitationslinien im Alphabereich (Abb.24b), wahrscheinlich die Orosomukoidlinie (OM = Alpha₁-Globulin), die Alpha₁- und Alpha₂-Glycoprotein- und die Alpha₂-Ceruleplasminlinie. Zwei dieser Linien enthielten Radioaktivität. Dagegen hatten sich die Gamma- und Betaglobulinlinie unter dieser Bedingung nicht abgebildet. Es wurden also jeweils die Proteine, die nach der Immunelektrophorese in der Nachbarschaft des OM* lagen, von einem Antikörpergemisch (Anti-Humanserum) geringfügig kopräzipitiert.



b

Abb.24: Kopräzipitation von Human-Orosomukoid mit anderen Serumproteinen

Oben: Färbung, Mitte: Autoradiographie, unten: Skizze der Autoradiographie.
 α_1 -Ak = Anti-Human-Alpha₁-Globulin,
 α_2 -Ak = Anti-Human-Gammaglobulin, A-HuS = Anti-Humanserum, HuS = Humanserum, OM* = J¹³¹-markiertes Human-Orosomukoid

4. Immunpräzipitation der Transaminasen nach Absorption der Antikörper

Ließen wir im Ouchterlony-Test ein GOT- oder GPT-Antiserum 1 unter Zusatz von gereinigtem Enzym gegen Schweineorganextrakte diffundieren, entstanden im allgemeinen keine Präzipitativlinien (Abb.25a, Loch 2 und 6, Abb.25b, Loch 2). Nur ein GPT-Antiserum zeigte auch nach Absorption mit GPT noch eine Präzipitation mit Schweineorganextrakt (Abb.25b, Loch 6).

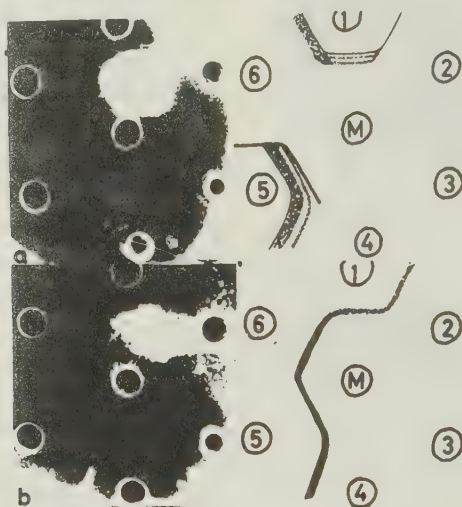


Abb.25: Präzipitation von Schweineorganextrakt-Transaminasen nach Absorption ihrer Antikörper durch Transaminasenzusatz zum Antiserum

Links das Originalfoto, rechts eine Skizze.

a: Präzipitation von Schweineorganextrakt-Transaminasen nach Absorption

M = Schweineorganextrakt, 1 - 4: GOT-Antiserum 1, 5 und 6; GOT-Antiserum 2;

bei 2 und 6 zusätzlich gereinigtes GOT, bei 3 zusätzlich Schweineherzextrakt, bei 4 zusätzlich Schweineleberextrakt.

b: Präzipitation von Schweineorganextrakt-Transaminasen nach Absorption

M = Schweineorganextrakt, 1 - 4: GPT-Antiserum 1, 5 und 6; GPT-Antiserum 2; bei

Das zum Antiserum 1 zugesetzte gereinigte Enzym absorbierte also auch die Antikörper, die sonst mit dem Gewebsextrakt reagierten. Das gleiche Ergebnis fanden wir bei Vorabsorption der Antiseren mit Schweineherz- oder Schweineleberextrakt (Abb.25a und b, Loch 3 und 4). Es war also bei einigen

Seren möglich, die Antikörper mit Schweineorganextrakten oder gereinigtem Enzym völlig zu absorbieren. Außerdem blieb noch soviel von dem zugesetzten Antigen ungebunden, daß es von dem reinen Antiserum 2, das aus dem Nachbarloch entgegendiffundierte (Abb.25a und b, Loch 1 und 5), präzipitiert werden konnte.

In Kontrollversuchen (Abb.25a und b, Loch 1 und 5) wurde das Antiserum statt mit Enzym (bzw. Organextrakt) mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und zeigte mit Schweinemuskelextrakt die gewohnte Präzipitation.

Ähnliche Versuche führten wir in der Immunelektrophorese durch. Wir mischten GOT mit einem GOT-Antiserum 1, GPT mit einem GPT-Antiserum 1 und ließen die Antigen-Antikörper-Gemische elektrophoretisch auftrennen. Diesen diffundierte dann ein zweites Antiserum, im ersten Fall ein GOT-Antiserum 2, im zweiten Fall ein GPT-Antiserum 2 entgegen. Das gereinigte Enzym reagierte hier im Gegensatz zu dem mit größerer Antigendosis durchgeführten Ouchterlony-Test (s.o.) nicht mehr mit dem Antiserum 2, da es offensichtlich während der gemeinsamen Elektrophorese mit dem Antiserum 1 von diesem absorbiert, d.h. gebunden wurde (Abb.26a und b im oberen Teil der Versuchsanordnung). Dagegen waren die Präzipitate in Kontrollversuchen bei gemeinsamer Elektrophorese von gereinigtem Enzym mit dem Serum nicht immunisierter Tiere und nachfolgender Diffusion gegen Antiserum vorhanden (Abb.26a und b im unteren Teil der Versuchsanordnung).

In einer anderen Anordnung trennten wir Organextrakte verschiedener Spezies auf und ließen sie anschließend gegen ein GOT- oder GPT-Antiserum diffundieren, dem zu gleichen Teilen ein Organextrakt beigemischt war, in einer Versuchsreihe Rattennierenextrakt, in einer anderen Humanherzextrakt. Die Absorption der Antikörper mit Rattennieren- und Humanherzextrakt gelang nicht oder nicht völlig, denn es entstanden die üblichen Präzipitatlinien mit den elektrophoretisch aufgetrennten Extrakten (Abb.26c und d).

Humanherz- und Rattennierenextrakt hatten unter der angewandten, nicht erschöpften Absorption nur einen kleinen Teil

der Antikörper gebunden, so daß der übrige noch ein anderes Antigen, z.B. Schweineleberextrakt, präzipitieren konnte. Von anderen Antigenen (reines Enzym und Schweineorganextrakte) jedoch wurden die Antikörper restlos absorbiert.

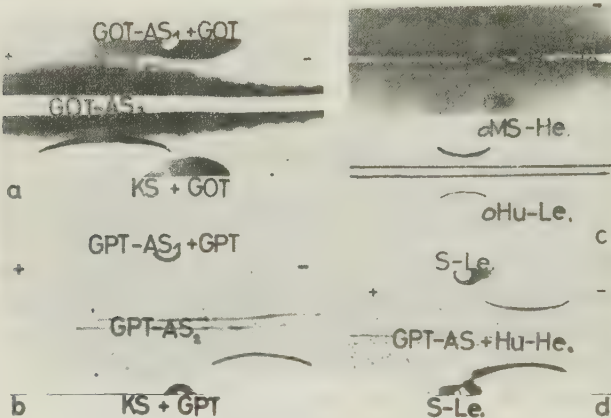


Abb. 26: Präzipitation von Transaminasen nach Absorption ihrer Antikörper durch Transaminasenzusatz zum Antiserum in der Immunelektrophorese

- a: Präzipitation von gereinigter GOT nach gemeinsamer Elektrophorese mit GOT-Antiserum bzw. Kontrollserum; oben: GOT-Antiserum 1 und GOT, unten: Kontrollserum und GOT, Mitte: GOT-Antiserum 2.
- b: Präzipitation von gereinigter GPT nach gemeinsamer Elektrophorese mit GPT-Antiserum 1 (oben) bzw. Kontrollserum (unten) Mitte: GPT-Antiserum 2.
- c: Präzipitation von Organextrakt-GOT nach Absorption der GOT-Antikörper mit Humanherzextrakt. Oben das Originalfoto, unten eine Skizze; oben: Meerschweinchenherzextrakt, unten: Humanleberextrakt, Mitte: GOT-Antiserum und Humanherzextrakt.
- d: Präzipitation von Organextrakt-GPT nach Absorption der GPT-Antikörper mit Humanherzextrakt. Oben und unten: Schweineleberextrakt in zwei verschiedenen Konzentrationen, Mitte: GPT-Antiserum und Humanherzextrakt.

5. Immunpräzipitation bei variabler Antigen-Antikörper-Relation

In unseren Agartests verwendeten wir anfangs gereinigte Enzyme mit einem Enzymproteingehalt von 2 mg und einer Enzymaktivität von 360 000 mU GOT bzw. 36 000 mU GPT in 1 ml Lösung; später verdünnten wir die Enzyme auf das Fünffache mit Aqua dest., nachdem wir festgestellt hatten, daß die Präzipitatlinien dabei ungefähr gleich stark auftraten.

Verdünnte man die 20%ig (auf das Feuchtgewicht bezogen) angesetzten Schweineorganextrakte mit dem gleichen Volumen Aqua dest., waren noch Präzipitatlinien sichtbar, bei fünffach verdünnten Schweineorganextrakten dagegen nicht mehr.

Die durchschnittliche Enzymaktivität des Homogenat-Überstandes der unverdünnten Schweineorganextrakte lag für GOT bei 2900 mU/mg Protein, für GPT bei 280 mU/mg Protein (38). - Der Überstand hatte einen durchschnittlichen Eiweißgehalt von 2 g%.

Die Antiseren wurden im allgemeinen unverdünnt gebraucht. In einigen Versuchen wurden sie eingeengt. In diesem Falle entstanden die Präzipitate im Ouchterlony-Test etwa einen Tag früher als bei nicht eingeengten Seren; die Präzipitatlinien in der Immunelektrophorese waren auch ohne Einengung nach einem Tag vorhanden (s. B 9b).

In den meisten Versuchen der Immunelektrophorese ließen wir ca. $3\text{ }\mu\text{l}$ eines Antigens (gereinigte Enzyme, fünffach verdünnt, Schweineorganextrakte, unverdünnt, bzw. Organextrakte anderer Spezies, auf rund ein Fünftel des Ausgangsvolumens eingeengt) elektrophoretisch auftrennen, das in die Löcher (s. Schema 1 und 2 bei B 9b) eingefüllt worden war. Nach der Elektrophorese ließen wir aus der Rinne ca. 0,15 ml Antiserum entgegendiffundieren. Bei umgekehrter Versuchsanordnung (Elektrophorese des Antiserums und erst anschließend Diffusion gegen das in der Rinne aufgetragene Antigen) war im Bereich der Antikörperdiffusion rund 50 mal mehr Antigen vorhanden als unter der bisherigen Bedingung, d.h. es bestand ein Antigen-Überschuß! Bei dieser Anordnung entstanden im allgemeinen keine Präzipitate, wahrscheinlich aber lösliche Komplexe. Nur Schweine- und Humanorganextrakte wurden gelegentlich noch durch das elektrophoretisch aufgetrennte Antiserum präzipitiert, nie aber das gereinigte Enzym (Abb. 27a - c). Wahrscheinlich war die hohe Antigen-Konzentration bei Humanorganextrakten notwendig, um überhaupt sichtbare Präzipitate zu bilden, so daß in diesem Falle also kein Antigen-Überschuß bestand.

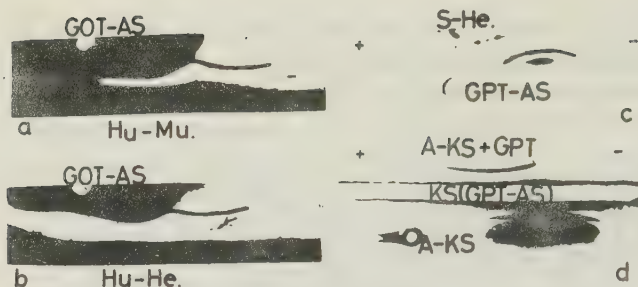


Abb. 27: Präzipitation von Organextrakt-Transaminasen im Vergleich mit der Präzipitation von Kaninchenserum durch Anti-Kaninchenserum nach Immunelektrophorese des Antikörpers

a und b: Präzipitation von Humanorganextrakt-GOT; oben: GOT-Antiserum, unten bei a) Humanmuskel-, bei b) Humanherzextrakt.
c: Präzipitation von Schweineorganextrakt-GPT; oben: Schweineherzextrakt, unten: GPT-Antiserum.
d: Präzipitation von Kaninchenserum; oben: Anti-Kaninchenserum und GPT, unten: Anti-Kaninchenserum, Mitte: Kaninchenserum (GPT-Antiserum)

Elektrophorese von	Diffusion gegen	neg.	pos.	Zahl der Versuche
GOT-Antiserum	gereinigte GOT	7	0	7
	Schweineorgane	3	0	3
	Humanorgane	4	8	12
GPT-Antiserum	gereinigte GPT	1	0	1
	Schweineorgane	3	3	6
	Humanorgane	11	1	12
insgesamt		29	12	41

Tab. 13: Präzipitation von Transaminasen nach Elektrophorese des Antiserums

Vergleichsweise untersuchten wir auch die Antigen-Antikörper-Relation bei der Präzipitation von Kaninchenserum durch ein Anti-Kaninchenserum der Ziege. Auch hier wurde das fünf-fach verdünnte Antigen Kaninchenserum in gleicher Weise durch Anti-Kaninchenserum präzipitiert wie unverdünntes.

Bei großem Antigen-Überschuß (elektrophoretische Auftrennung des Anti-Kaninchenserums) traten auch hier noch Präzipitatlinien auf, wie die Abb. 27d im unteren Teil der Versuchsanordnung zeigt. Im oberen Teil der Versuchsanordnung dagegen, wo das Anti-Kaninchenserum gemeinsam mit GPT auf-

getrennt wurde, wo also noch weniger Antiserum vorhanden war, entstand nur die GPT-Linie. Offenbar war hier die zur Verfügung stehende Menge von Anti-Kaninchenserum zu gering, um noch eine sichtbare Präzipitation des Kaninchenserums (als Antigen) herbeizuführen.

Bei der Verdünnung des Anti-Kaninchenserums auf das Fünf- bzw. Zehnfache dagegen, also bei relativem Antigen-Überschuß, entstanden zwar noch einige Linien, jedoch immer weniger und schwächere, je weniger Antikörper angeboten wurden (Abb.28). Bei der Diffusion von fünffach verdünntem Anti-Kaninchenserum (Loch 5 in Abb.28) waren z.B. nur zwei schwache Linien zu erkennen statt der fünf bis sieben deutlichen Linien, die bei unverdünntem Antikörper auftraten (s. auch C III, 1a und c).

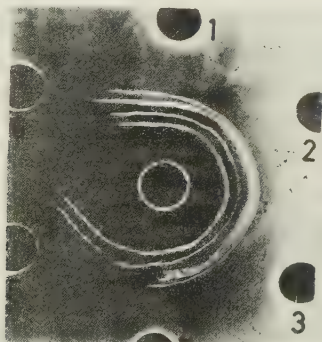


Abb.28: Präzipitation von Kaninchenserum durch Anti-Kaninchenserum bei variablem Antikörper-Angebot

M = Kaninchenserum, 1 - 5: Anti-Kaninchenserum in von 1 - 5 immer geringer werdender Konzentration.

II. Einfluß von Alterung und Hitzeeinwirkung auf die Präzipitationseigenschaften der Antiseren, Enzyme und Extrakte

1. Alterung

Die Antiseren wurden unter Zusatz einer geringen Menge Natriumazid bei -20° C aufbewahrt und waren auf diese Weise monatelang ohne erkennbare Änderung ihrer Antikörper-Eigenschaften haltbar.

Desgleichen wurden die Organextrakte bei -20° C aufbewahrt. Die Einfrierung hatte auf die Präzipitationseigenschaften ebenso wie bei den Seren keinen Einfluß.

Zur Untersuchung der Alterung der Extrakte wurden sie vorübergehend bei 4° C aufbewahrt. Dabei zeigte sich, daß ihre Enzymaktivität mit zunehmender Alterung geringer wurde (38).

Die gereinigten Transaminasen wurden bei 4° C aufbewahrt. Auch bei ihnen blieb die Antigenität monatelang unverändert.

2. Hitzeeinwirkung

Ein Teil eines GOT-Antiserums wurde zehn Minuten lang bei 40, 50 und 65° C erhitzt. Auch danach entstanden sowohl im Ouchterlony-Test wie in der Immunelektrophorese die üblichen Präzipitatlinien (Abb.29). Die Antikörper-Eigenschaft des Serums war also erhalten geblieben. Sie ging erst bei 70° C mit der Ausflockung verloren.

GOT wurde einmal drei Tage lang bei 37° C aufbewahrt, ohne dadurch seine Antigenität zu verlieren.

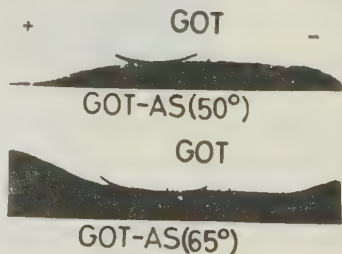


Abb.29: Präzipitation von gereinigter GOT durch hitzedenaturierte GOT-Antiseren

Oben jeweils gereinigte GOT, unten bei a) ein GOT-Antiserum, das 10 Minuten bei 50° C, bei b) ein GOT-Antiserum, das 10 Minuten bei 65° C erhitzt wurde.

1. Einfluß der Transaminasen auf die Immunpräzipitation von
Serumproteinen

1. Transaminasenzusatz zum Antigen

a) Transaminasenzusatz zu Kaninchenserum

Bei der Diffusion von Kaninchenserum gegen ein Anti-Kaninchenserum von der Ziege (AKS) entstanden im Ouchterlony-Test fünf bis sieben Linien (Abb.28, Loch 1). Die innerste davon entsprach der Albuminpräzipitation, die äußerste der Gammaglobulinpräzipitation.

Ließen wir nun das Kaninchenserum gemeinsam mit GOT oder GPT (gleiche Volumina) gegen das AKS diffundieren, waren manche Linien abgeschwächt, andere verstärkt. Ein typisches Beispiel zeigt die Abb.30a, wo die Präzipitation von Kaninchenserum (Loch 1 und 4) mit derjenigen eines Kaninchenserum-Enzym-Gemisches (Loch 2, 3, 5 und 6) verglichen wurde. Beim Kaninchenserum 1 (Loch 1 - 3) erschien die Albuminlinie durch GOT-Zusatz (Loch 2) abgeschwächt, durch GPT-Zusatz (Loch 3) dagegen verstärkt, desgleichen die Alphalinie. Die Betalinien wurden durch beide Enzyme abgeschwächt, während die Gammalinie wesentlich stärker war als im Kontrollversuch (Loch 1). Außerdem war hinter der Gammalinie noch eine weitere entstanden. Auch beim Kaninchenserum 2 (Loch 4 - 6) wurden die Albumin- und Alpha-Präzipitationslinien durch Enzymzusatz abgeschwächt, und zwar bei GPT-Zusatz stärker (Loch 6). Die Betalinie dagegen wurde durch GOT-Zusatz (Loch 5) verstärkt, während die Gammalinie hierbei gegenüber der Kontrolle (Loch 4) keine Abweichung zeigte. Auch bei diesem Serum trat jedoch die zusätzliche Linie hinter der Gammalinie auf. In einigen Versuchen wurde allerdings auch eine Abschwächung, in zwei sogar Fehlen der Gammalinie beobachtet. In seltenen Fällen, besonders bei GPT-Zusatz, waren alle Linien abgeschwächt.

In den Versuchen wurden sowohl Seren nicht immunisierter Tiere als auch Transaminasen-Antikörper-haltige Seren be-

nutzt. Die Ergebnisse waren in beiden Fällen annähernd gleich.

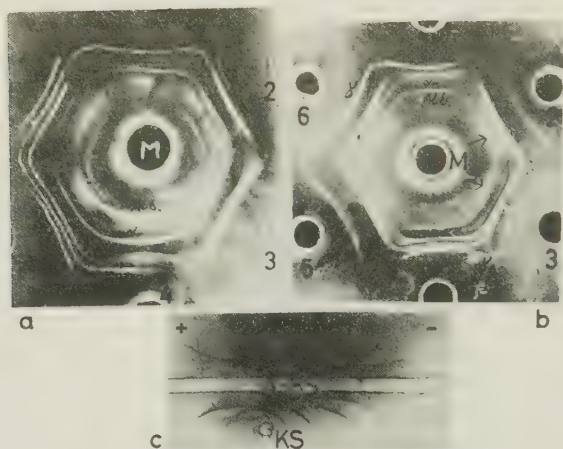


Abb.30: Präzipitation von Kaninchenserum durch Anti-Kaninchenserum bei Transminessenzusatz zum „Antigengemisch“ Kaninchenserum
 a und b: Beispiele für die Präzipitation im Ouchterlony-Test;
 M = Anti-Kaninchenserum; bei a: 1 - 3 = Kaninchenserum 1, 4 - 6 = Kaninchenserum 2, bei 2 und 5 GOT-, bei 3 und 6 GPT-Zusatz; bei b: 1 und 4 = Kaninchenserum, in den übrigen Löchern GOT-Antiserum, d.h. Kaninchenserum von einem immunisierten Tier, bei 1 - 3 GOT-, bei 4 - 6 GPT-Zusatz.
 c: P-Präzipitation in der Immunelektrophorese; oben: Kaninchenserum und GOT, unten: Kaninchenserum. Mitte: Anti-Kaninchenserum.

In der Abb.30b wurde die Präzipitation des Serums eines nicht immunisierten Tieres (Loch 1 und 4) mit der Präzipitation von Seren des gleichen Tieres, das aber inzwischen mit GOT immunisiert worden war, verglichen (Loch 2, 3, 5 und 6). In den Löchern 1 - 3 wurde GOT, in den Löchern 4 - 6 GPT zugesetzt. Es fällt auf, daß bei den Antiseren eine zusätzliche Linie vor der Albuminlinie entstanden ist, die bei GOT-Zusatz (Loch 2 und 3) besonders deutlich, aber auch bei GPT-Zusatz (Loch 5 und 6) erkennbar ist, und die beim Kontrollserum (Loch 1 und 4) fehlt. Die Alpha Linie war beim Antiserum gegenüber dem Kontrollserum abgeschwächt, die Beta Linie dagegen verstärkt, und zwar nur bei GPT-Zusatz (Loch 5 und 6). Zwischen der Beta- und Gammalinie war bei dem Antiserum-GOT-Gemisch (Loch 3) eine weitere Linie zu finden (GOT-GOT-Antiserum-Komplex?). Besonders auffällig war

die Gammapräzipitation. Während die Linie beim Kontrollserum (Loch 1 und 4) stark ausgebildet war und dicht an der Betalinie lag (Loch 1) bzw. diese sogar berührte (Loch 4), war sie bei den Antiseren wesentlich schwächer; auch war der Abstand zwischen der Beta- und Gammalinie größer als bei Kontrollserum. Dieses Phänomen trat in gleicher Weise bei GOT- und GPT-Zusatz zum Antiserum, das aber nur GOT-Antikörper enthielt, auf, beruhte also nicht auf der Bildung langsam wandernder Antigen-Antikörper-Komplexe.

Trennte man vor der Immundiffusion das Kaninchenserum (als Antigen) gemeinsam mit GOT bzw. GPT elektrophoretisch auf und ließ es dann gegen ein Anti-Kaninchenserum der Ziege diffundieren, so erfolgte die Präzipitation genau so, als wenn ein Kaninchenserum gleicher Konzentration allein gegen den Antikörper diffundierte (Abb.30c). Der größte Teil des Kaninchen-Gammaglobulins reagierte also auch noch nach der gemeinsamen Elektrophorese mit den Transaminasen als Antigen, war also nicht (als Antikörper gegen diese) durch GOT oder GPT besetzt.

b) Transaminasenzusatz zu Humanserum

GOT- bzw. GPT-Zusatz zu Humanserum oder isolierten Proteinen (gleiche Volumina) hatte keinen Einfluß auf ihre Präzipitation durch Anti-Humanserum, weder im Ouchterlony-Test (17 Versuche, Abb.31a) noch in der Immunelektrophorese (24 Versuche, Abb.31b).

Dagegen verzögerte der Zusatz von Spuren von Farbstoffen (Bengalrosa und Bromphenolblau) zu Human-Albumin dessen Präzipitation durch Anti-Human-Albumin um einen Tag.

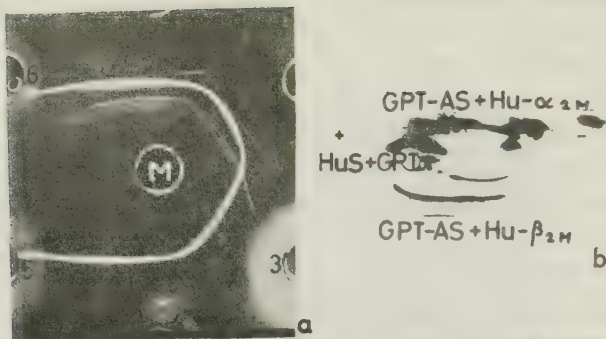


Abb. 31: Präzipitation von Humanserumproteinen durch ihre Antikörper bei Transaminasenzusatz zum Antigenmisch Humanserum

- a: im Ouchterlony-Test; M = Anti-Humanserum, 1 und 2 = Human-Gammaglobulin, 3 und 4 = Human-Beta₂-Globulin, 5 und 6 = Human-Alpha₂-Globulin, bei 2, 4 und 6 GOT-Zusatz.
b: in der Immunelektrophorese; oben: GPT-Antiserum und Anti-Human-Alpha₂-Globulin, unten: GPT-Antiserum und Anti-Human-Beta₂-Globulin, Mitte: Humanserum und GPT.

2. Transaminasenzusatz zum Antikörper

a) Transaminasenzusatz zu Anti-Kaninchenserum von der Ziege

Setzte man das Enzym (GOT oder GPT) dem Anti-Kaninchenserum (AKS) zu und ließ dieses Gemisch im Ouchterlony-Test gegen ein Kaninchenserum (als Antigen) diffundieren, traten alle Linien im Vergleich zur Präzipitation zwischen Kaninchenserum und AKS allein wesentlich später und abgeschwächt auf oder fehlten ganz (Abb. 32a und b). Die Präzipitation von Kaninchenserum durch AKS wurde also durch den Enzymzusatz zum Antikörper behindert, und zwar bei GPT-Zusatz stärker als bei GOT-Zusatz.

b) Transaminasenzusatz zu Anti-Humanserum

GOT- oder GPT-Zusatz zu einem Anti-Humanserum hatte im Ouchterlony-Test keinen Einfluß auf seine Antikörper-Eigenschaften (Abb. 32c); es trat hier weder Verstärkung noch Abschwächung der Präzipitate durch die Enzyme auf. Im Original sah man zunächst scharfe Linien und die übliche, leicht

eckige Präzipitationsfigur. Erst nach 8 - 10 Tagen entstand das verschwommene Bild, das in Abb.32c zu sehen ist. Die hier in relativ großer Menge vorhandenen Enzyme (gleiches Volumen wie Anti-Humanserum) werden nicht gebunden und breiten sich allmählich über die ganze Agarplatte aus. Dabei haben sie anscheinend die Fähigkeit, die bestehenden Präzipitate aus Humanserum und Anti-Humanserum in der oben beschriebenen Weise zu beeinflussen.

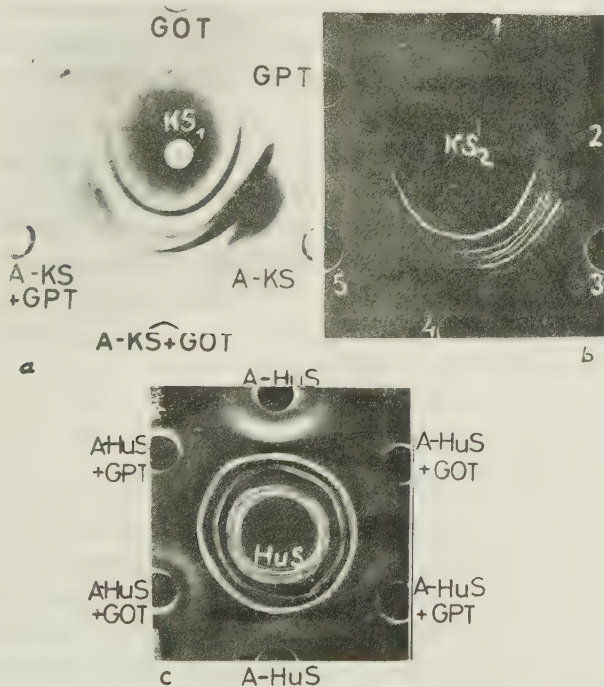


Abb.32: Präzipitation von Kaninchenserum durch Anti-Kaninchenserum im Vergleich mit der Präzipitation von Humanserum durch Anti-Humanserum bei Transaminasenzusatz zum Antikörper

- a und b: Präzipitation von Kaninchenserum; KS₁ und KS₂ = verschiedene Kaninchenserum, A-KS = Anti-Kaninchenserum von der Ziege. 1 - 5 bei b) wie bei a).
- c: Präzipitation von Humanserum (HuS); A-HuS = Anti-Humanserum. Bei 5 und 6 wurden die Transaminasen in geringerer Konzentration zugesetzt als bei 2 und 3.

IV. Immunpräzipitation von Transaminasen in vitro (Heidelberger-Teste) - Versuch einer quantitativen Erfassung löslicher und präzipitierender Antigen-Antikörper-Komplexe

Um die Präzipitation der Transaminasen durch ihre Antikörper bei variablem Antigen- oder Antikörper-Angebot zu erfassen, führten wir Heidelberger-Teste durch. Auch wollten wir damit feststellen, wieviel % der Enzymaktivität im Sediment gebunden waren und wieviel % in löslichen Antigen-Antikörper-Komplexen.

Antigen und Antikörper wurden gemischt, eine Stunde bei 37°C inkubiert und 12 - 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Danach war ein Niederschlag entstanden, der in den jeweils gleichzeitig durchgeführten Kontrollversuchen fehlte.

1. Variation des Antikörper-Angebotes bei konstantem Antigen-Angebot

a) Versuche mit GOT und GOT-Antiserum

Zu je 72 000 mU GOT = 0,4 mg Protein, gelöst in 1 ml (die Originallösung der gereinigten Schweineherz-GOT enthielt 360 000 mU/ml), setzten wir 1 ml, 0,2 ml, 0,1 ml und 0,05 ml Antiserum zu. Das Volumen wurde mit physiologischer Kochsalzlösung jeweils auf 2 ml aufgefüllt. Bei Zusatz von 1 ml oder 0,2 ml Antiserum erfolgte eine mittelstarke, bei Zusatz von 0,1 ml eine schwache Präzipitation der GOT, während ein Zusatz von 0,05 ml Antiserum, d.h. Verdünnung des Antiserums auf 1 : 20, bereits keine sichtbare Präzipitation mehr bewirkte.

b) Versuche mit GPT und GPT-Antiserum

Hier wurden je 7 200 mU GPT = 0,4 mg Protein, gelöst in 1 ml (die Originallösung der gereinigten Schweineherz-

GPT enthielt 36 000 mU/ml), mit 1 ml, 0,2 ml, 0,1 ml und 0,05 ml Antiserum gemischt. Die Auffüllung des Volumens auf 2 ml pro Ansatz erfolgte wiederum mit Physiologischer Kochsalzlösung. Auch hier entstand ein mittelstarker Niederschlag bei Zusatz von 1,0 und 0,2 ml Antiserum und ein schwächerer bei Zusatz von 0,1 ml Antiserum. Abweichend von der GOT-Präzipitation wurde die GPT aber auch noch durch das geringste Antikörper-Angebot von 0,05 ml Antiserum präzipitiert.

c) Versuche mit Hepatitisserum und GPT-Antiserum

Als Antigen benutzten wir hierbei das Serum eines Hepatitis-Kranken, das 670 mU GPT/ml enthielt. Zu je 1 ml des Serums wurde wieder 1 ml, 0,2 ml, 0,1 ml, 0,05 ml Antiserum sowie in einem Versuch 1 ml eines auf 1/5 des ursprünglichen Volumens eingeeengten GPT-Antiserums zugesetzt und wieder mit Kochsalzlösung auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Das konzentrierte und das unverdünnte Antiserum präzipitierten die GPT im Hepatitisserum in einem Niederschlag, der aber geringer war als in den vorangegangenen Versuchen (s. 1b) mit höherem GPT-Angebot (7200 mU/ml). Bei geringerem Antikörper-Angebot (Verdünnung der Antiseren) war die Präzipitation nur sehr schwach, in einem Versuch mit dem gleichen Hepatitisserum gar nicht sichtbar. Bei den früher beschriebenen Untersuchungen mit den Agarpräzipitations-Methoden zeigte Hepatitisserum nie eine Präzipitation mit GPT-Antiserum. Allerdings konnten wir mit jenen Methoden nur sehr geringe Mengen untersuchen (maximal 0,05 ml im Ouchterlony-Test, in der Immunelektrophorese noch bedeutend weniger), die offenbar nicht ausreichten, um in Agar sichtbare Präzipitate entstehen zu lassen.

GOT-Antiseren präzipitierten die GOT in einem Hepatitisserum nicht. Allerdings betrug der GOT-Gehalt des verwendeten Serums nur 235 mU/ml.

2. Variation des Antigen-Angebotes bei konstantem Antikörper-Angebot

In drei Versuchsreihen wurde jeweils 1 ml Antiserum, in zwei weiteren nur das gefällte Gammaglobulin des Antiserums als 1,3%ige Lösung angeboten. Das hinzugefügte Antigen, d.h. die GOT- oder GPT-Lösung, wurde mit physiologischer Kochsalzlösung so verdünnt, daß die in Tab. 14 angegebenen Enzymproteinwerte pro ml resultierten.

Schon bei einem Angebot von 0,004 mg Enzymprotein (das sind 72 mU GPT bzw. 720 mU GOT) war eine leichte Trübung sichtbar, die mit steigendem Enzymangebot stärker wurde und zwischen 0,04 - 0,2 mg Enzymprotein, d.h. bei 720 - 3 600 mU GPT bzw. 7 200 - 36 000 mU GOT, ein Maximum erreichte. Bei noch höherem Antigen-Angebot nahm die Niederschlagsmenge wieder ab (s. Tab.14).

Antigen-Angebot mg Protein/ml	2,0	1,0	0,4	0,2	0,1	0,04	0,02	0,004
GOT	+	(+)	++	+++	++++	+++	++(+)	+
GPT	+	+	++	+++	++++	+++	++(+)	+(+)

Tab.14: Präzipitationsstärke von GOT und GPT im Heidelberger-Test (Durchschnittswerte aus je 5 Versuchsreihen)

1 ml gereinigtes Enzym = 2 mg Protein = 360 000 mU
GOT bzw. 36 000 mU GPT

In einigen Versuchen wurde das Enzym mit J^{131} markiert. Dadurch war es möglich, seinen Anteil im Immunpräzipitat durch Radioaktivitätsmessung quantitativ zu erfassen. Es fand sich ein Maximum der GOT-Bindung im Sediment bei Inkubation von 0,04 mg (7200 mU) mit 1 ml Antiserum; hier wurden 62 % der GOT-gebundenen Radioaktivität präzipitiert.

Die maximale GPT-Bindung lag ebenfalls bei einem Angebot von 0,04 mg (720 mU); sie betrug 72 % des Angebotes.

Es fand sich also für beide Enzyme eine Übereinstimmung mit der maximalen Trübung.

Hatten wir aber statt des Antiserums nur das Antikörperhaltige Gammaglobulin (1,3%ige Lösung) benutzt, betrug die

maximale GOT-Bindung durch GOT-Antikörper im Sediment bei einem Angebot von 0,004 mg Enzymprotein (720 mU) 42 %, die GPT-Bindung durch GPT-Antikörper bei einem Angebot von 0,004 mg (72 mU) 43 %.

Die im Immunpräzipitat gebundene GOT- oder GPT-Radioaktivität wurde in Prozent der Radioaktivität des jeweils angebotenen Enzyms berechnet. Unter der experimentell nachgeprüften Voraussetzung, daß die Antigen-Eigenschaft des Enzyms durch die radioaktive Markierung nicht geändert wurde, bezeichnet die prozentuelle Radioaktivität den prozentuellen Enzymanteil im Präzipitat und läßt sich folglich in mU GOT oder GPT ausdrücken.

Findet man z.B. bei einem Angebot von 18 000 mU GOT (0,1 mg Enzymprotein) 30 % der Enzym-Radioaktivität im Sediment, so heißt das umgerechnet, daß 5 400 mU GOT durch Antikörper präzipitiert wurden.

Die im Präzipitat gebundene Enzymaktivität wurde (als Ordinate in Abb.33, mittlere Kurven) mit dem jeweiligen Enzymangebot (Abszisse) in bezug gesetzt. Es fand sich danach für die GOT, ähnlich der groben Bestimmung durch Ablesen der Trübung (s. Tab.14) ein Maximum der Präzipitation. Dieses lag in zwei Versuchsreihen bei 20 - 40 000 mU Angebot. Die GPT-Bindungskurve zeigte kein Maximum. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Originallösung der GPT nur den zehnten Teil der Enzymaktivität der Original-GOT-Lösung enthielt. Aus technischen Gründen war es nicht möglich, die GPT so zu konzentrieren, daß ihre Enzymaktivitätswerte denen der GOT glichen. Es ist zu vermuten, daß die maximale GPT-Bindung im Sediment erst bei wesentlich höherem Enzymangebot erfolgte.

Die gleichzeitige Bestimmung der Enzymaktivitätshemmung (32, 33a) zeigte, daß ein höherer Prozentsatz des Enzyms gehemmt wurde, als er sich im Präzipitat befand. Es waren also auch lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe entstanden, in denen die Enzymaktivität neutralisiert wurde. Die Differenz zwischen prozentueller Enzymaktivitätshemmung und prozentueller Enzymbindung im Präzipitat zeigte den Anteil an löslichen Antigen-Antikörper-Komplexen. Sie wurden in den oberen Kurven der Abb.33 dargestellt. Ihre Menge stieg bei den GOT- und GPT-Versuchen mit steigendem Antigen-Angebot, auch noch jenseits des Präzipitationsmaximums (vgl. mittlere Kurven).

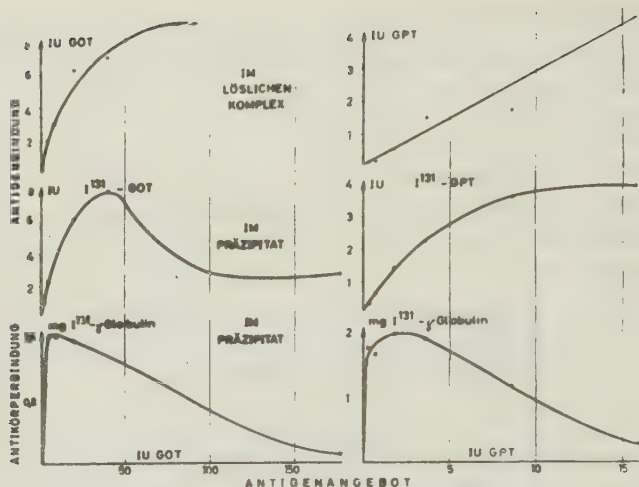


Abb.33: Präzipitation von gereinigten Transaminasen im Heidelberger-Test bei konstantem Antikörper-Angebot von 1 ml Antiserum und variablem Antigen-Angebot

Links: Präzipitation von GOT durch GOT-Antiserum; rechts: Präzipitation von GPT durch GPT-Antiserum.

Die oberen und mittleren Kurven resultierten aus Versuchen mit radioaktiv markiertem Antigen, die unteren aus Versuchen mit radioaktiv markiertem Antikörper-Globulin.

Die prozentuelle Bindung des Antikörper-Globulins wurde untersucht, indem dieses in zwei parallelen Versuchsreihen mit J^{131} markiert wurde. Das Ergebnis wurde im unteren Teil der Abb.33 dargestellt. Es zeigte sich ein Maximum der Antikörper-Globulin-Bindung bei einem Angebot von 0,1 mg = 1800 mU GPT, wo 1,86 % des Antikörper-Globulins, bzw. bei einem Angebot von 0,1 mg = 18 000 mU GOT, wo 1,6 % des Antikörper-Globulins gebunden wurden.

In den Versuchen, wo die Trübung am stärksten war, war also auch der größte Anteil des Antikörper-Globulins gebunden. Auch fiel die maximale GOT-Bindung ungefähr mit der maximalen Antikörper-Globulin-Bindung zusammen, jedoch war eine Linksverschiebung des Antikörper-Maximums gegenüber dem GOT-Maximum festzustellen. Durch Simultanmarkierung von Antigen und Antikörper in einer Versuchsreihe (mit zwei verschiedenen Jod-Isotopen) muß noch geklärt werden, ob diese Abwei-

chung der Maxima von Gammaglobulin- und GOT-Präzipitation reell ist oder nur durch ungewollte Abweichung der Versuchsanordnung der Parallelversuche vorgetäuscht.

Schließlich bestimmten wir noch den Proteingehalt des Sedimentes mit der Biuret-Methode. Bei einem Angebot von 0,2 mg = 36 000 mU GOT fanden wir den größten Proteingehalt mit 1,57 mg im Sediment, bei den GPT-Versuchen lag das Maximum mit 1,41 mg pro Sediment bei einem Angebot von 0,2 mg = 3 600 mU.

Bei den GOT-Versuchen fiel der Proteingipfel ungefähr mit dem Enzym-Radioaktivitätsgipfel zusammen, bei den GPT-Versuchen zeigte sich bei ca. 4000 mU GPT-Angebot ein Maximum, während ein Gipfel in der Radioaktivitätskurve der GPT-Bindung im Sediment im untersuchten Bereich nicht erreicht wurde (s. Abb.33). Es ist hier die Fehlerbreite der Biuret-Methode bei der geringen Eiweißmenge zu berücksichtigen.

D. Allgemeine Diskussion

Bei der Präzipitation von gereinigter GPT durch ihr Antiserum im Agar fanden wir - bis auf eine Ausnahme (AS 4) - stets nur eine Linie. Hier handelt es sich also um ein homogenes Antigen.

Anders verhielt sich die gereinigte GOT im Ouchterlony-Test; in rund der Hälfte aller Versuche wurde sie durch ihr Antiserum in zwei, in einem Viertel der Versuche in drei und nur in einem Viertel in einer Linie präzipitiert (s. Tab.1).

Es ist bekannt, daß mitunter ein einziges Antigen in Agar-tests mehrere Präzipitatlinien bildet (12, 47, 48), wenn es mehrere determinante Gruppen hat, die alle zur Antikörperbildung anregen können. P.BURTIN (4) fand sogar zwei sich überkreuzende Linien bei einem einzigen Antigen, nämlich bei der Präzipitation von Human-7S-Gammaglobulin durch ein Anti-Gammaglobulinserum vom Kaninchen. Es kommt hinzu, daß die einzelnen Versuchstiere - selbst gleicher Spezies - die Immunisierung mit dem gleichen Antigen sehr unterschiedlich beantworten (2, 12, 17, 36, 55). Es kann also sein, daß einige Tiere nur gegen eine determinante Gruppe des Antigens Antikörper gebildet haben, andere Tiere nur gegen eine andere oder gegen mehrere dieser Gruppen. Solche Antiseren können selbst ein homogenes Antigen in mehreren Linien präzipitieren (48). Wir beobachteten allerdings auch mit demselben Antiserum unterschiedlich viele Linien in verschiedenen Versuchen.

Auch die Konzentration von Antigen und Antikörper hat Einfluß auf die Zahl der entstehenden Präzipitate. P.GRABAR (17) beschreibt z.B. die Entstehung mehrerer Linien von einem homogenen Antigen bei hoher Antigen- oder Antikörperkonzentration. Ö.OUCHTERLONY (47) beobachtete, daß eine Diphtherie-Bakterien-Aufschwemmung von dem homologen Antiserum in drei Linien präzipitiert wurde. Dagegen präzipitierte das gleiche Antiserum eine konzentriertere Bakterien-Aufschwemmung nur in einer Linie. Ließ er jedoch die Antigenlösung in der ur-

sprünglichen Konzentration gegen ein Antiserum diffundieren, das er durch Immunisierung mit der konzentrierteren Antigenlösung erzielt hatte, so entstanden sechs Linien. Im ersten Versuch diffundierten also etwa äquivalente Mengen von Antigen und Antikörper gegeneinander, im zweiten (konzentrierte Antigenlösung) relativ viel mehr Antigen als Antikörper und im dritten (Antiserum gegen die konzentrierte Antigenlösung) relativ viel mehr Antikörper als Antigen. Bei Verschiebung der Antigen-Antikörper-Relation zugunsten des Antigens entstanden also weniger, bei Verschiebung zugunsten der Antikörper mehr Linien als bei der Diffusion äquivalenter Mengen. Auf unsere Versuche übertragen würde das bedeuten: Bei Diffusion äquivalenter Mengen von Antigen und Antikörper entstehen - wie in den meisten unserer Versuche - zwei Linien. Ist die Antigen-Antikörper-Relation zugunsten des Antigens verschoben (durch zufällig höhere Konzentration der verwendeten GOT oder durch besonders niedrigen Antikörpergehalt einiger Seren), entstehen weniger Linien, also nur eine! Ist die Antigen-Antikörper-Relation aber zugunsten der Antikörper verändert (durch zufällig niedrigere GOT-Konzentration oder durch besonders hohen Antikörpergehalt der Antiseren), so entstehen mehr, also drei Linien (größte von uns beobachtete Zahl von Linien).

Auch ein Gemisch aus mehreren Isoenzymen kann entsprechend viele Präzipitatlinien geben (15, 37, 41, 64). Man könnte also daran denken, daß in der zur Immunisierung benutzten GOT drei Isoenzyme enthalten waren. Dagegen spricht jedoch, daß es nach allen anderen Untersuchungen nur zwei Isoenzyme der GOT gibt (33b), von denen nur eines (das cytoplasmatische) zur Immunisierung verwendet worden war. Eine Erklärung dafür, daß in der Immunelektrophorese zwischen der gereinigten GOT und ihrem Antikörper stets nur eine Linie entstand, im Ouchterlony-Test dagegen öfters zwei bis drei Linien nachweisbar waren, bieten vielleicht die unterschiedlichen Mengenverhältnisse von Antiserum und Antigen bei beiden Methoden, nämlich gleiche Volumina von Antigen und Antiserum (0,03 - 0,05 ml) im Ouchterlony-Test, aber nur eine sehr kleine Antigenmenge (0,003 ml), die in der Immunelektropho-

rese gegen eine große Antikörpermenge (0,15 ml) diffundierte. Es ist bekannt, daß die Sichtbarkeit eines Präzipitates nicht nur von der Antigen-Antikörper-Relation, sondern auch von der absoluten Antigen- und Antikörpermenge abhängig ist. Es wäre also auch denkbar, daß es sich bei den verschiedenen Linien im Ouchterlony-Test um die Präzipitationen von Verunreinigungen des Enzyms handelt, die jedoch in so geringen Mengen vorhanden sind, daß sie unter den Bedingungen des Ouchterlony-Testes gerade noch sichtbar präzipitiert werden, in der Immunelektrophorese dagegen wird die Sichtbarkeitsgrenze nicht erreicht. Zwar sollen mit der Methode der Immunelektrophorese nach P. GRABAR (17) bereits Spuren von Verunreinigungen nachweisbar sein, was aber wohl nur für die Makromethode zutreffend ist. In der von uns angewandten Mikro-modifikation von J.J. SCHEIDEGGER (54) gibt es sogar Präzipitate, die weder photographisch darzustellen noch mit dem Auge zu erkennen sind (s. Abb. 17c, obere Teil-Abb., wo keine GPT-Linien zu sehen sind!) In der Autoradiographie sind jedoch deutlich Linien abgebildet (s. Abb. 17c, untere Teil-Abb.), ein Beweis dafür, daß an der entsprechenden Stelle eine Präzipitation erfolgt ist. Wenn also in der Immunelektrophorese färbereich nur eine Linie sichtbar ist, so ist das noch kein Beweis für die Homogenität eines Antigens. Es können auch hier daneben noch weitere, unsichtbare Präzipitate vorhanden sein.

Eine andere Erklärung für die Abweichung der GOT-Präzipitation im Ouchterlony-Test und in der Immunelektrophorese wäre, daß die GOT nur während der verhältnismäßig langsamen Diffusion im Ouchterlony-Test (5 - 10 Tage) in mehrere Komponenten, verschiedene Polymere oder Spaltprodukte des Enzyms, dissoziiert. Demgegenüber beschrieben viele Autoren (12, 35, 58, 64, 67) die Aufsplitterung eines homogenen Antigens in mehrere Komponenten nur in der Immunelektrophorese. Möglicherweise ist die sehr kurze Diffusionszeit in der Immunelektrophorese (1 - 2 Tage) aber nicht ausreichend, um eine Aufspaltung des GOT-Moleküls zu bewirken.

In der Überwanderungselektrophorese (s. C I, 1c), wo gereinigte GOT während der Elektrophorese über ein Human- oder Kaninchenserum (Nichtimmunserum) wanderte und dann gegen GOT-Antiserum diffundierte, traten zwei Linien auf, und zwar eine im Alpha_1 -, eine im Alpha_2 -Globulinbereich (s. Abb.4). Hierbei dürfte es sich wohl am ehesten um eine Komplexbildung unspezifischer Art zwischen einer GOT-Komponente und einem schnell wandernden Serumprotein handeln oder um den Transport einer GOT-Komponente durch ein Serumprotein. Ein solcher Komplex kann aus zwei oder mehr Proteinen bestehen und elektrophoretisch anders wandern als seine einzelnen Bestandteile (12, 64). Wanderte dagegen GOT über ein Antiserum, und ließ man dann von der Seite nochmals ein Antiserum dagegen-diffundieren, so war nur noch eine Präzipitatlinie, nämlich die der langsamer wandernden Komponente, sichtbar. Die schnellere Komponente wurde während der Überwanderung abgefangen und erschien als Präzipitat zwischen den Rillen (s. Abb.4).

Im Gegensatz zur gereinigten GOT zeigt der Organextrakt mit GOT-Antiserum in der Immenoelektrophorese im allgemeinen zwei Linien, eine im Alpha_1 -, eine im Betaglobulinbereich. Diese Heterogenität der Schweineorganextrakt-GOT kann einmal darauf beruhen, daß bei der Homogenisierung der Organe Proteinasen frei werden, die die GOT abbauen, so daß zwei Spaltprodukte entstehen, die elektrophoretisch anders wandern als das intakte Enzymmolekül. Eine andere Möglichkeit wäre, daß im Extrakt Monomere der GOT vorhanden sind, die bei hochgereinigtem Enzym polymerisiert sind. Demnach könnte die Linie I der Abb.8a und b der Präzipitation des Monomers entsprechen, die Linie II der eines Dimers, das in der gereinigten GOT vorhanden ist. Die Linie III ist wohl am ehesten als Spaltprodukt aufzufassen, denn einmal ist sie oft nur verschwommen sichtbar, zum anderen zeigt sie mit der Linie II keine Kreuzreaktion, sondern Teilidentität (s. Abb.8). Der experimentelle Beweis für diese Interpretation steht noch aus. Die Tatsache, daß jede der beiden Fraktionen der Schweineorganextrakt-GOT anscheinend Antikörper entstehen läßt, die nicht miteinander kreuzreagieren (s. Abb.10) spricht dafür, daß die entstehenden "Spaltprodukte" bzw. die "Monomere" des Enzyms unterschiedliche Antigenität besitzen.

Auch in der gereinigten GOT sind noch in geringer Menge "Monomere" enthalten. Das zeigt die Autoradiographie der Abb.8a (untere Teil-Abb.), wo auch die Linie I geringgradig radioaktiv ist, obwohl nur die gereinigte GOT, nicht aber der Organextrakt, mit J^{131} markiert war. Umgekehrt kann auch im Extrakt eine geringe Menge von Polymerisationsprodukten vorhanden sein, die in der Immunelektrophorese die Sichtbarkeitsgrenze nicht erreichen (deshalb Fehlen von II im Schweineorganextrakt), im Ouchterlony-Test aber zu erkennen sind (s. Abb.7). Eine schnell wandernde Komponente der gereinigten GOT ist hier identisch mit einer langsamer diffundierenden der Extrakt-GOT. Die stärkste Linie der gereinigten GOT (nahe der Antigen-Auftragsstelle) würde der Linie II in Abb.8 (d.h. dem fraglichen Dimer) entsprechen, die anderen Linien der gereinigten GOT den Linien I und III der Extrakt-GOT.

Bei zweizeitiger Agarelektrophorese, wo erst die gereinigte GOT* (= J^{131} -GOT) zur Elektrophorese aufgetragen wurde und eine halbe Stunde später ein Gemisch aus gereinigter GOT* und Schweineherzextrakt, wird möglicherweise die jetzt an andere Stelle gebrachte "polymerisierte" GOT an die monomere angelagert. Deshalb ist unter diesen Bedingungen auch die Linie I sehr deutlich ausgeprägt, wie die Autoradiographie in der unteren Hälfte der Abb.8b zeigt.

Schließlich besteht die Möglichkeit, daß die Extrakt-GOT ähnlich wie die gereinigte GOT in der Überwanderungselektrophorese mit anderen Proteinen des Extraktes Assoziationen eingeht und dadurch in andere Bereiche gelangt als die gereinigte GOT.

Die veränderte Präzipitation von Kaninchenserum durch Anti-Kaninchenserum bei Enzymzusatz zum Antigen oder Antiserum (s. C III) könnte ebenfalls auf solchen Proteinassoziationen mit einigen Serumproteinen beruhen. Solche Komplexe könnten infolge ihrer Größe langsamer als die ursprünglichen Proteine diffundieren, was das spätere Erscheinen einiger Linien, den unterschiedlichen Abstand und das Auftreten

neuer Linien (Komplex an anderer Stelle als die Bestandteile) erklären würde. In extremen Fällen dürften sie gar nicht mehr diffundieren, da die Maschen des Agarnetzes nach den Beobachtungen von A.J.CROWLE (12) für große Moleküle im allgemeinen nicht durchgängig sind (Fehlen einiger Linien). Ist nur ein Teil der betreffenden Serumproteine im Komplex enthalten, so ist die entsprechende Proteinlinie abgeschwächt. Die Verstärkung einiger Präzipitatlinien durch Enzymzusatz zum Antigen könnte darauf beruhen, daß sich an das Präzipitat aus einem Kaninchenprotein und einem Antikörper der Ziege noch GOT bzw. GPT unspezifisch anlagert, wobei das bereits vorhandene Präzipitat als Barriere wirken kann, was Ö.OUCHTERLONY (48) z.B. für Hühner- bzw. Entenei-Albumin und Antiserum vom Kaninchen nachweisen konnte.

Um das Präzipitationsoptimum festzustellen, untersuchten wir die Präzipitation bei variablem Antigen- oder Antikörper-Angebot im Agar- und Heidelberger-Test. Nach H.SCHMIDT (55) darf das Antiserum höchstens auf 1 : 50 verdünnt werden, um noch sichtbare Präzipitate zu liefern. In unseren Versuchen wurde das Antigen in einer Konzentration von 0,04 % Protein schon bei einer Verdünnung des Antiserums auf 1 : 20 nicht mehr präzipitiert. In Versuchen mit Antikörpern gegen Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase sahen S.HARSHMAN und Mitarbeiter (22) bereits bei einer Antiserum-Verdünnung auf 1 : 10 kein Präzipitat mehr. Entweder war also bei dieser Verdünnung die kritische Konzentration nicht erreicht, die zur Bildung sichtbarer Präzipitate notwendig ist, oder es bestand bereits Antigenüberschuß, wo ja bekanntlich ebenso wie bei verschiedenen Antigenen unter Antikörperüberschuß nur lösliche Komplexe entstehen (12, 17, 46, 47, 48, 50, 54, 55, 56, 66).

Dadurch lassen sich auch die Ergebnisse der Tab.13 erklären. In diesen Versuchen hatten wir 0,003 ml Antiserum elektrophoretisch aufgetrennt, eine sehr geringe Menge im Verhältnis zur Menge des Antigens, von dem 0,15 ml (nach der Elektrophorese) in der Rinne aufgetragen wurden. Zwischen den

gereinigten Transaminasen bzw. den Schweineorganextrakten und den Antiseren waren infolge des bestehenden Antigenüberschusses nur lösliche Komplexe entstanden. Daß die Humanorganextrakte in dieser Versuchsanordnung (Auftragung von 0,15 ml in der Rinne) besser präzipitiert worden als in der üblichen (Auftrennung des Antigens), liegt offensichtlich an der erst jetzt ausreichenden Antigenkonzentration der Extrakte.

Die Untersuchung der Präzipitation bei variablem Antigenangebot ergab ferner, daß die Transaminasen auch noch in der stärksten von uns angewandten Verdünnung, nämlich 1 : 200 (d.h. pro ml 0,004 mg Protein bzw. 72 mU für GPT oder 720 mU für GOT), von 1 ml ihres jeweiligen Antiserums präzipitiert wurden. Im untersuchten Bereich wurde unter unserer Versuchsbedingung das Enzymprotein nie zu 100 % präzipitiert; vielmehr betrug die maximale Präzipitation bei der GOT 62 %, bei der GPT 72 % des Angebotes, was wir durch Radioaktivitätsmessung der mit J^{131} markierten Enzyme ermittelten. Wie die Enzymaktivitätshemmung (32) jedoch zeigte, waren außerdem noch lösliche Komplexe entstanden, analog zur Präzipitation von Rinder-LDH (36), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (37) und Cholin-Esterase (64) durch ihre Antikörper, wo ebenfalls lösliche Komplexe neben den unlöslichen entstanden sind. Die maximale Bindung (d.h. lösliche und unlösliche Komplexe) betrug bei GPT 91,8 %, bei GOT 99,8 %. Wie wir fanden auch zahlreiche Autoren bei anderen Enzym-Antikörpern keine 100%ige Hemmung und Präzipitation (7, 15, 18, 25, 27, 36, 37, 43, 44, 58, 59, 63, 70). Nur in seltenen Fällen wurde eine völlige Hemmung der Enzymaktivität (d.h. 100%ige Präzipitation) festgestellt, so für Antikörper gegen Lecithinase (71), Carbamyl-Phosphat-Synthetase (35) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus Hefe (5).

In den Versuchen, in denen wir statt des Gesamtserums nur das Gammaglobulin als Antikörper verwandt hatten, wurden maximal nur 42 % der GOT und 43 % der GPT (gemessen an der Radioaktivität) präzipitiert. Dieser Unterschied ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß die Enzyme in diesen Versuchen

möglicherweise stärker jodiert waren, und daß dadurch ihre Präzipitierbarkeit herabgesetzt wurde, in ähnlicher Weise, wie auch die Präzipitierbarkeit der Antikörper durch zu starke Jodierung vermindert wird, was erstmals von D.PRESSMAN und G.RADZIMSKI (50) beschrieben wurde. Dafür waren aber hier mehr lösliche Komplexe vorhanden, so daß die Gesamtbindung der Enzyme in löslichen und unlöslichen Komplexen für GPT 92,8 % und für GOT 99,6 % betrug, die Ergebnisse also hierin übereinstimmten.

Während die maximale Antigenbindung im Präzipitat bei einem Angebot von 0,04 mg Enzymprotein pro ml (d.h. 7200 mU GOT bzw. 720 mU GPT) erfolgte, lag das Maximum der Antikörperbindung bei einem Angebot von 0,1 mg Enzymprotein pro ml (d.h. 18 000 mU GOT bzw. 1 800 mU GPT). Diese Abweichung zwischen den Maxima dürfte zeigen, daß Antikörpermoleküle mit geringerer Affinität zum Antigen erst bei größerem Antigenangebot gebunden werden, während das Antigen verständlicherweise bei relativ höherem Antikörperangebot vollständiger präzipitiert wird. In den verschiedenen Bereichen existieren bei der GOT und GPT offensichtlich Antigen-Antikörper-Komplexe verschiedener Zusammensetzung.

Bei den Untersuchungen auf evtl. bestehende Partialantigen-Identität der Transaminasen mit irgendwelchen Humanserumproteinen beobachteten wir neben einer immunologischen Partialidentität zwischen GPT und Human-Gammaglobulin eine nicht-immunologische Kopräzipitation von GOT und GPT mit Humanserumproteinen sowie die Kopräzipitation einiger Serumproteine untereinander. Voraussetzung waren Bedingungen, bei denen die betreffenden Proteine (z.B. durch veränderten Auftragsort eines Proteins, s. C I 3) in näheren Kontakt miteinander gebracht wurden. Man könnte daran denken, daß diese Kopräzipitationen durch Verunreinigung der zur Immunisierung benutzten Antigene entstanden sind. Dagegen spricht jedoch, daß mehrere Linien in der Autoradiographie nur dann sichtbar waren, wenn ein Antigengemisch gegen ein Antikörpergemisch diffundierte, nicht aber, wenn die verschiedenen Antikörper allein auf das Antigengemisch trafen. So wur-

de z.B. GOT nie von einem Antiserum gegen irgendein Human-serumprotein präzipitiert. Diffundierte die radioaktiv mar-kierte GOT aber in Humanserum gegen ein Antikörpergemisch, so waren mehrere Humanserumproteinlinien in der GOT-Autora-diographie abgebildet, d.h. kopräzipitiert worden (s. C I, 3b). Ferner spricht gegen eine bloße Verunreinigung die Tat-sache, daß abhängig vom Auftragungsort des J^{131} -markierten Antigens verschiedene Proteine kopräzipitiert wurden. Das zeigt sich besonders deutlich in den Versuchen mit J^{131} -mar-kiertem Orosomukoid (OM*). Wurde dieses zur Elektrophorese nahe der Kathode aufgetragen, lag es nach dem Elektrophore-selauf im Betaglobulinbereich und kopräzipitierte mit Beta-globulinen. Wanderte es dagegen von der Mitte des Objekt-trägers aus, lag es nach der Elektrophorese natürlich im Alphaglobulinbereich (OM = α_1 -Globulin) und kopräzipitier-te mit mehreren Alphaglobulinen. Ein als Verunreinigung vor-händenes, mit-etikettiertes zweites Protein würde unabhän-gig von solchen methodischen Variationen an der ihm ent-sprechenden Stelle präzipitiert. Unter geeigneten Versuchs-bedingungen (s. C I, 3b) war bei J^{131} -Gammaglobulinzusatz zu nicht markiertem Serum sogar die Albuminlinie geringgra-dig radioaktiv. Es dürfte sich nach all diesen Befunden bei den beobachteten Phänomenen um nichtimmunologische Kopräzi-pitationen handeln.

Bei den Untersuchungen auf Kreuzreaktionen der gereinigten Schweineherz-GOT und -GPT mit anderen Antigenen, mit dem gleichen Antigen aus anderen Organen der gleichen Spezies oder mit dem gleichen Antigen verschiedener Spezies ergab sich zunächst eine Enzymspezifität der Transaminasen-Anti-körper. Sowohl in den Präzipitations- wie in den Hemmtesten (32, 33a, 38) zeigte sich, daß GOT- und GPT-Antiseren weder untereinander kreuzreagierten noch andere Enzyme präzi-pitierten oder hemmten (s. C I, 1a und b). Ebenso enzymspezi-fisch verhalten sich z.B. Streptokokken-Desoxyribonuclease-Antikörper, die auch nur das homologe Enzym, nicht aber Streptokokken-Hexokinase und -Hyaluronidase hemmen (7), und

Weizen-Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-Antikörper, die nicht mit Weizen-Hexokinase kreuzreagieren (29).

G.W.NAGE (41) untersuchte Antikörper gegen Frosch-LDH-Isoenzyme und beobachtete sogar eine Isoenzymspezifität. Antikörper gegen Rinder-LDH-Isoenzyme (36) oder Hühner-LDH-Isoenzyme (25) dagegen zeigten deutliche Kreuzreaktionen untereinander, also keine Isoenzymspezifität. Andere Enzym-Antikörper reagieren sowohl mit dem Enzym als auch mit einer Enzym-Vorstufe oder auch mit anderen Enzymen; so reagieren z.B. Pepsinogen-Antikörper (2, 65) auch mit Pepsin, Streptokokken-Proteinase-Antikörper (20) auch mit einer Proteinase-Vorstufe und mit Streptolysin, Kalbspankreas-Ribonuclease-Antikörper (58) auch mit Chymotrypsin. Bei diesen besteht also keine Enzymspezifität.

Im Gegensatz zur Enzymspezifität fand sich keine Organspezifität der Transaminasen-Antikörper. Obwohl sich das gleiche Enzym aus verschiedenen Organen einer Spezies immunologisch sehr unterschiedlich verhalten kann (43), sind doch nur wenige Enzym-Antikörper mit Organspezifität beschrieben worden, z.B. Rinderpankreas-Ribonuclease-Antikörper (59), die keine Kreuzreaktion mit Rinderserum-Ribonuclease-Antikörpern zeigen, und die Antikörper gegen alkalische Phosphatase aus Hunde- und Human-Darmtrakt (43), die mit dem gleichen Enzym anderer Organe nicht reagierten. Wir stellten jedoch fest, daß alle verwendeten Organextrakte trotz sehr unterschiedlichen Enzymgehaltes (50 - 200 mU für GPT, 50 - 2000 mU für GOT) etwa gleich stark von den Transaminasen-Antikörpern präzipitiert wurden (s. C I, 2f). In den Hemmtests (38) zeigte sich eine relative Organspezifität insofern, als die Transaminasen aus Herz- und Skelettmuskelextrakt durch die Antiseren stärker gehemmt wurden als die der übrigen Extrakte. Der spätere Nachweis einer Isoenzymspezifität der GOT-Antiseren zeigte, daß die Unterschiede durch unterschiedliche Isoenzymzusammensetzung der Extrakte verschiedener Organe bedingt waren (33b).

Unsere Ergebnisse zur Organspezifität gleichen denen anderer Autoren, die z.B. Antikörper gegen alkalische Phospha-

tase aus Humanorganen (3 im Gegensatz zu 43, s.o.!), Amylase (14, 15), LDH (18, 43, 44), Xanthinoxydase (63), Phospho-Hexose-Isomerase und Phosphorylase (beide 43) untersuchten und ebenfalls keine Organspezifität feststellten.

Betrachten wir nun die Speziesspezifität. Wir stellten fest, daß die Schweineherz-Transaminasen mit Human-, Ratten- und Meerschweinchenorgan-Transaminasen kreuzreagierten. Es bestand eine relative Speziesspezifität nur insofern, als die kreuzreagierenden Antigene nicht regelmäßig und trotz starker Einengung der Organextrakte wesentlich schwächer durch die Antiseren präzipitiert wurden als die homologen Antigene (Schweineherz-GOT und -GPT). Mit Kaninchenorgan-Transaminasen wurde keine Kreuzreaktion festgestellt (s. Tab.13). Die relative Speziesspezifität zeigte sich auch in den Hemmtests (32, 33a), wo die Enzymaktivität der gereinigten und der Schweineorganextrakt-Transaminasen sehr stark, die der Humanorganextrakt-Transaminasen weniger, die der Ratten- und Meerschweinchenorganextrakt-Transaminasen noch weniger und die der Kaninchenorganextrakt-Transaminasen gar nicht durch die gegen das Schweine-Enzym gerichteten Antikörper gehemmt wurden. Viele bisher in der Literatur beschriebenen Enzym-Antikörper waren nicht speziesspezifisch, sondern zeigten wie unsere Transaminasen-Antikörper Kreuzreaktionen mit verschiedenen Spezies, von denen einige in Tab.15 zusammengestellt wurden.

Literatur	6	14	14	14	18	18	18	35	37	43	45 57	61	63	65	71	
Enzym:	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
Spezies:																
Mensch				•	+				•	+			+	+		+
Affe				+												
Pferd	+				+									+		
Rind	•				0	•		+			+		•			
Schwein		•	•								•			•		•
Schaf					+				+		0					
Ziege		X														
Hund	+	+			+					•						
Kaninchen	X	X	+	X	•		+	+X	+X	OX	OX	X	X	X	X	OX
Ratte			X					+	+	0			0			+
Meerschwein.								-			+					+
Maus					+	+	•		+							
Huhn					OX	X	X	0			0					
Truthahn					X	X	X									
Taube								+								
Schlange															+	
Salamander								+								
Frosch								•								
Fisch								0								
Bakterien															•	
Sojabohnen												+				
andere Bohnen												•				
Hefe									0							

Tab.15: Kreuzreaktionen von Enzym-Antikörpern mit den Enzymen verschiedener Spezies

Freie Spalten: nicht untersucht; X = immunisierte Spezies;
• = Spezies, mit deren Enzymen immunisiert wurde; + = Kreuzreaktion; 0 = keine Kreuzreaktion.

a = Leber-Katalase
b u. c = Pankreasamylase
d = Speichelamylase
e = Muskel-LDH
f u. g = Herz-LDH
h = Carbamyl-Phosphat-Synthetase
i = Erythrozyten-Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

j = Leber-Phospho-Hexose-Isomerase
k = Pepsin
l = Urease
m = Sahne-Xanthinoxydase
n = Magenschleimhaut-Pepsinogen
o = Clostridium-Welchii-Lecithinase
p = Herz-Transaminase

Demgegenüber fanden andere Autoren speziesspezifische Enzym-Antikörper, u.a. die Antikörper gegen Tyrosinase einer Pilzart (1), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus Weizen (29), Rinder-LDH (36), alkalische Phosphatase aus Human- und Hunde-Darmtrakt (43), Penicillinase (49) und Antikörper gegen Carbamyl-Phosphat-Synthetase (35), jedoch nur, wenn diese von der Ziege, nicht aber wenn sie von Kaninchen gewonnen wurden; Kaninchen-Antikörper zeigen Kreuzreaktionen mit Carbamyl-Phosphat-Synthetase verschiedener Spezies.

Infolge der fehlenden Organ- und Speziesspezifität fanden wir eine Präzipitation von GPT in Hepatitisseren durch Antiseren gegen Schweineherz-GPT im Heidelberger-Test. Auch wurde die Enzymaktivität der Hepatitisseren durch die Transaminasen-Antikörper bis zu 70 % gehemmt (33a). Trotzdem konnten wir nie eine Präzipitation von Hepatitisseren im Agartest feststellen. Allerdings wurden hierbei - durch die Versuchsanordnung bedingt - nur geringe Mengen Antigen und Antikörper untersucht, so daß offenbar die sogen. kritische Konzentration (48) nicht erreicht wurde, die zur Bildung sichtbarer Antigen-Antikörper-Komplexe erforderlich ist. Auch P.GRABAR (17) gibt an, daß eine Substanz in sehr geringer Konzentration nur entdeckt wird, wenn man große Mengen der entsprechenden Lösung untersucht. J.S.NISSELBAUM und Mitarbeiter (43) beschreiben eine Präzipitation von Hepatitisserum durch Antikörper gegen Humanleber-LDH, während ihre Antikörper gegen Humanherz-LDH so gut wie keine Kreuzreaktion mit Hepatitisserum zeigten, offensichtlich infolge des Fehlens von Antikörpern gegen das in Leber überwiegende Isoenzym.

Zwischen GPT und Humanserum-Gammaglobulin besteht eine immunologische Verwandtschaft; wir sahen eine einseitige Kreuzreaktion zwischen Human-Gammaglobulin und Schweineherz-GPT, nicht zwischen Human-Gammaglobulin und Schweineherz-GOT (s. C I, 3a). Am Human-Gammaglobulin scheint es eine determinante Gruppe zu geben, die auch am GPT-Molekül vorhanden ist, dort aber nur Haptencharakter hat, so daß es zur Reaktion von Anti-Human-Gammaglobulinserum mit GPT, nicht aber von GPT-Antiserum und Human-Gammaglobulin kommen kann, Wenn je-

doch GPT und Gammaglobulin zusammen gegen Anti-Gammaglobulinserum diffundieren, wird das korrespondierende Antigen bevorzugt oder ausschließlich präzipitiert. Das zeigt sich z.B. in Abb.16a. In Loch 2 und 6 ist die gleiche Menge Anti-Gammaglobulinserum enthalten. Bei 6) hat dieses die gereinigte GPT (im Mittelloch) deutlich präzipitiert, bei 2) kaum, da in Loch 3 das korrespondierende Antigen Gammaglobulin vorhanden ist und der Antikörper offensichtlich eine größere Affinität dazu als zu GPT hat. Infolge des großen Antigenüberschusses ist jedoch kein sichtbares Präzipitat zwischen Gammaglobulin und seinem Antikörper entstanden, sondern nur ein löslicher Komplex. Auch in Abb.17b ist die GPT nicht von Anti-Gammaglobulinserum präzipitiert worden, da dieses sich mit seinem korrespondierenden, schneller diffundierenden Antigen verbunden hat.

Auffällig ist die Präzipitation der Meerschweinchenorganextrakt-Transaminasen. Während GOT nur in einigen Immunelektrophorese-Versuchen präzipitiert wurde, ergab sich eine GPT-Präzipitation nur im Ouchterlony-Test, wo jeweils gleiche Volumina von Antigen- und Antikörperlösung gegeneinander diffundierten. In der Immunelektrophorese dagegen diffundierte eine kleine Antigenmenge (0,003 ml) gegen eine viel größere Antiserummenge (0,15 ml). Die unterschiedlichen Ergebnisse können also nur darauf zurückzuführen sein, daß die von uns angewandten Bedingungen des Ouchterlony-Testes für die Präzipitation der Meerschweinchen-GOT nicht optimal waren, so daß keine sichtbaren Präzipitate entstehen konnten, während die Meerschweinchen-GPT in zwei Versuchen präzipitiert wurde. Für das Auftreten sichtbarer Präzipitate sind die absolute Menge und das Mengenverhältnis von Antigen und Antikörper entscheidend. Unter den Bedingungen der Immunelektrophorese waren zwischen Meerschweinchen-GPT und GPT-Antiserum anscheinend nur lösliche Komplexe entstanden, während für Meerschweinchen-GOT das Präzipitationsoptimum erst jetzt erreicht war.

Scheinbare Kreuzreaktionen eines Antigens mit völlig anderen, mit dem gleichen Antigen verschiedener Spezies oder mit dem gleichen Antigen verschiedener Organe der gleichen Spezies können auf Verunreinigungen des Antigens beruhen. Schon Spuren von anderen Antigenen können Kreuzreaktionen vortäuschen (55). Einige Autoren (22, 40, 42) führen Kreuzreaktionen auf Anti-Antikörper zurück, die nach längerer Immunisierungsdauer gegen Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet werden. Danach sollen nach der Erstimmunisierung Antikörper I gegen das injizierte Antigen gebildet werden. Antigen und Antikörper verbinden sich in vivo zu einem Antigen-Antikörper-Komplex, gegen den Antikörper II entstehen. Sie lagern sich dem Komplex an und geben nun Anlaß zu Antikörper-III-Bildung etc. Solche Anti-Antikörper sind unspezifisch und reagieren daher auch mit Antigen-Antikörper-Komplexen, die andere Antigene enthalten. Schließlich kann eine Kreuzreaktion durch Ähnlichkeit oder teilweise Übereinstimmung der kreuzreagierenden Antigene zustandekommen, z.B. beruht die Kreuzreaktion zwischen Human-7S γ (γ_1)- und -19S γ (β_{2M})-Globulin darauf, daß ein Teil des 7S-Moleküls mit einem Teil des 19S-Moleküls übereinstimmt (21).

Zum Schluß möchten wir noch einige Überlegungen zum Ort der Antikörper-Bindung am Enzymmolekül anstellen. Nur in seltenen Fällen greift der Enzym-Antikörper an der aktiven Gruppe eines Enzyms an, die wahrscheinlich bei vielen Spezies identisch und deshalb im Vergleich zu den anderen Molekülbestandteilen nicht antigen ist (9); auch ist die aktive Gruppe im Vergleich zum gesamten Enzymmolekül nur sehr klein (28, 64). Wenn also Antikörper dagegen gebildet werden sollten, dann wohl nur in ganz geringer Konzentration neben anderen Antikörpern, die woanders am Enzymmolekül angreifen, und nur bei sehr langer Immunisierungsdauer. B.CINADER (9) nimmt an, daß die zuerst gebildeten Antikörper gegen Molekülgruppen gerichtet sind, die sehr weit von der aktiven Gruppe entfernt liegen. Mit weiterer Immunisierung sollen Antikörper gegen Molekülgruppen gebildet werden, die näher

an der aktiven Gruppe oder sogar direkt benachbart gelegen sind. Erst nach sehr langer Immunisierung entstehen nach B.CINADER schließlich auch einige Antikörper gegen die aktive Gruppe. Enzym-Antikörper können am Co-Enzym oder am Apo-Enzym gebunden werden. Die letzte Gruppe von Enzym-Antikörpern dürfte wohl die häufigste sein. Dabei handelt es sich im allgemeinen um präzipitierende Antikörper (9, 39, 52). Daß die meisten beschriebenen Enzym-Antikörper auch die Enzymaktivität hemmen, ist am ehesten auf sterische Behinderung der aktiven Gruppe durch die Antikörpermoleküle zurückzuführen, wie sie u.a. von B.CINADER (9), J.E.ULTMANN und P.FEIGELSON (63) und J.URIEL (64) beschrieben wurde.

Es ist anzunehmen, daß auch die Transaminasen-Antikörper wie die meisten Enzym-Antikörper am Trägerprotein angreifen. Obwohl unsere Antiseren Hyperimmunseren sind (die Tiere wurden über lange Zeit immunisiert und mehrfach nachimmunisiert), scheinen sie keine Antikörper zu enthalten, die gegen die aktive Gruppe gerichtet sind, da wir nie eine Reaktion der Antiseren mit den Transaminasen der immunisierten Spezies (Kaninchen) feststellten.

E. Zusammenfassung

=====

1. Antiseren vom Kaninchen gegen gereinigte Schweineherz-GOT präzipitieren nur GOT, Antiseren gegen gereinigte Schweineherz-GPT nur GPT; beide sind also enzymspezifisch. Sie reagieren mit den Transaminasen aus Rohextrakten verschiedener Organe etwa ebenso stark wie mit den gereinigten Schweineherz-Enzymen, sind also nicht organspezifisch. Sie zeigen Kreuzreaktionen mit den Spezies Mensch, Ratte und Meerschweinchen. Die Präzipitate sind hier jedoch erst bei höherer Konzentrierung der Organextrakte nachweisbar. GPT-Antiserum zeigt im Heidelberger-Test auch eine Präzipitation mit nicht konzentriertem Hepatitisserum, GOT-Antiserum nicht.

Mit Kaninchen-Transaminasen zeigt sich keine Kreuzreaktion; die Antikörper haben also keine Autoantikörper-Eigenschaft.

2. GPT wird im Ouchterlony-Test und in der Immunelektrophorese nur in einer Linie präzipitiert. Sowohl die gereinigte als auch die Extrakt-GPT wandern in der Immunelektrophorese im Betaglobulinbereich.

Die gereinigte GOT und die noch im Organextrakt befindliche Schweineherz-GOT werden im Ouchterlony-Test meistens in zwei Linien präzipitiert, Human-, Ratten- und Meerschweinchen-GOT dagegen durch Antikörper gegen Schweine-GOT nur in einer Linie. Diese zeigt Identitätsreaktion mit einer Präzipitatlinie des gereinigten oder des Schweineorganextrakt-Enzyms. In der Immunelektrophorese bildet die gereinigte GOT nur eine Linie im α_2 -Globulinbereich, ebenso die Human- und Meerschweinchen-GOT, während Ratten-GOT im Betaglobulinbereich und Schweineorganextrakt-GOT im α_1 - und Betaglobulinbereich präzipitiert werden.

3. Human-Gammaglobulin-Antikörper des Kaninchens präzipitieren gereinigte Schweineherz-GPT etwa gleich stark wie ihr homologes Antigen, aber GPT-Antiserum präzipitiert nicht Human-Gammaglobulin. Es besteht also eine einseitige Kreuzreaktion.

Gereinigte Schweineherz-GOT und -GPT zeigen unter geeigneten Bedingungen nichtimmunologische Kopräzipitationen mit einigen Humanserum-Proteinen.

4. Bei der quantitativen Immunpräzipitation beider Enzyme im Heidelberger-Test zeigen sich selbst in der sogen. Äquivalenzzone maximaler Präzipitation zusätzlich lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe mit gehemmter Enzymaktivität.

1 ml GOT-Antiserum bindet maximal 7186 mU GOT (0,039 mg Enzymprotein), d.h. 99,8 % des Angebotes; 1 ml GPT-Antiserum bindet maximal 661 mU GPT (0,037 mg Enzymprotein), d.h. 91,8 % des Angebotes.

5. Die Präzipitation von Kaninchenserum durch Ziegenantikörper wird durch Transaminasen-Zusatz behindert, wahrscheinlich infolge unspezifischer Komplexbildung zwischen den Transaminasen und einigen Serumproteinen.

F. Literaturverzeichnis

=====

- 1) Adams, H. M.:
The Reaction between the Enzyme Tyrosinase and its Specific Antibody
J. exp. Med. (1942), 76, 175
- 2) Arnon, R. and G. E. Perlmann:
Antibodies to Pepsinogen and Pepsinogen Modifications
Ann. N.Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 744
- 3) Boyer, S. H.:
Human Organ Alkaline Phosphatases: Discrimination by Several Means including Starch Gel Elektrophoresis of Antienzyme-Enzyme Supernatant Fluids
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 938
- 4) Burtin, P.:
Immunochemical Studies on Antigenic Structure of Human α - and β_2 -Globulins
in: Immunopathology, IIIrd Internat. Symp., La Jolla (California) 1963, edited by Grabar, P. and P. A. Miescher, 38
- 5) Bussard, A. E.:
Reaction Kinetics of the Four-Component System: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, Substrate, Coenzyme and Antibody Behaviour of Serum from Tolerant Rabbits
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 890
- 6) Campbell, D. H. and L. Fourt:
Immunochemistry of Catalase
J. biol. Chem. (1939), 129, 385
- 7) Mc.Carty, M.:
The Inhibition of Streptococcal Desoxyribonuclease by Rabbit and Human Antisera
J. exp. Med. (1949), 90, 543
- 8) Mc.Carty, M.:
Purification and Properties of Desoxyribonuclease Isolated from Beef Pancreas
J. gen. Physiol. (1946), 29, 123
- 9) Cinader, B.:
Immunochemistry of Enzymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 495
- 10) Cinader, B. and K. J. Lafferty:

Antibody as Inhibitor of Ribonuclease: The Role of Steric Hindrance, Aggregate Formation and Specificity
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 653

- 11) Cohn, M. and A. M. Torriani:
J. Immunol. (1952), 69, 471, zit. b. 49)
- 12) Crowle, A. J.:
Immunodiffusion, Acad. Press New York and London 1961
- 13) Garen, A.:
10th Symp. Soc. gen. Microbiol. (1960), 239, zit. b. 49)
- 14) Mc.Geachin, R. L. and J. M. Reynolds:
Differences in Mammalian Amylases Demonstrated by Enzyme Inhibition with Specific Antisera.
J. biol. Chem. (1959), 234, 1456
- 15) Mc.Geachin, R. L.:
Immunochemical Characterization of Amylase Isozymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 1009
- 16) Grabar, P. et C. A. Williams:
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin
Biochim. biophys. Acta (1953), 10, 193
- 17) Grabar, P.:
Immuno-electrophoretic Analysis
Meth. biochem. Anal. (1959), 7, 1
- 18) Gregory, K. F. and F. Wróblewski:
Preparation and Properties of Purified Antilactic Dehydrogenase
J. Immunol. (1958), 81, 359
- 19) Haas, R.:
Biochem. Z. (1940), 305, 280, zit. b. 55)
- 20) Halbert, S. P.:
Naturally Occurring Human Antibodies to Streptococcal Enzymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 1027
- 21) Harboe, M. and C. K. Osterland:
Genetically Determined Structures of Immune-Globulins in: Immunopathology, IIIrd Internat. Symp., La Jolla (California) 1963, edited by Grabar, P. and P.A. Miescher, 13

- 22) Harshman, S., J. P. Robinson and V. A. Najjar:
The Mechanism of Antibody-Antigen-Interaction and the
Theory of Subcomplementarity between the Reactive Sites
of Antibody and Antigen
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 688
- 23) Hiramatsu, Y.:
Jap. 1941, ref. Chem. Zbl. 1942 II, zit. b. 55)
- 24) McIvor, B. C. and H. D. Moon:
J. Immunol. (1959), 82, 328, zit. b. 12)
- 25) Kaplan, N. O. and S. White:
Immunological Characteristics of Dehydrogenases
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 835
- 26) Kenney, F. T.:
Immunochemical Analysis of the Induction of Tyrosine-
 α -Ketoglutarate Transaminase in Rat Liver
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 1083
- 27) Kirk, J. S. and J. B. Sumner:
Anturease, J. biol. Chem. (1931/32), 94, 21
- 28) Koshland, D. E., Jr.:
Properties of the Active Site of Enzymes,
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 630
- 29) Krebs, E. G. and V. A. Najjar:
The Inhibition of d-Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydro-
genase by Specific Antiserum
J. exp. Med. (1948), 88, 569
- 30) Kubowitz, F. und P. Ott:
Biochem. Z. (1943), 314, 94, zit. b. 55)
- 31) Lang, N.:
Ein Verfahren zum Nachweis von Reaktionen vom Typ der
Antigen-Antikörper-Bindung
Klin. Wo.Schr. (1955), 33, 29
- 32) Lang, N. und S. Massarrat:
Antikörper gegen Transaminasen
Verh. Dtsch. Ges. Physiol. Chem., 15. Mosbacher Kollo-
quium: Immunchemie, Mosbach 1964
- 33a) Lang, N. und S. Massarrat:
Versuche zur immunologischen Enzymbestimmung mit Trans-
aminasen-Antikörpern
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. (1962), 68, 275

- 33b) Lang, N. und S. Massarrat:
Immunologie und Enzymkinetik der Transaminasen verschiedener Organe
XII. Colloq.: "Protides of the Biological Fluids", Brügge 1964
- 34) Leiers, H. und F. Albrecht:
Fermentforschung (1926), 8, 52, zit. b. 59)
- 35) Marshall, M. and P. P. Cohen:
An Immunochemical Study of Carbamyl Phosphate Synthetase
J. biol. Chem. (1961), 236 (3), 718
- 36) Markert, C. L. and E. Appella:
Immunochemical Properties of Lactate Dehydrogenase Isozymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 915
- 37) Marks, P. A. and E. A. Tsutsui:
Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Studies on the Relation between Antigenicity and Catalytic Activity - the Role of TPN
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 902
- 38) Massarrat, S. und N. Lang:
Organspezifität von Antikörpern gegen Herzmuskel-Transaminasen
Transact. 7th Internat. Congr. Intern. Med. (1962 I), 508
- 39) Maurer, P. H.:
Nature of Antigenic Determinants in Proteins and Synthetic Polypeptides
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 549
- 40) Milgrom, F. and S. Dubiski:
Antigenicity of Antibodies of the Same Spezies
Nature, (1957), 179, 1351
- 41) Nace, G. W.:
Tissue Localization of Multiple Forms of Enzymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 980
- 42) Najjar, V. A. and J. Fisher:
The Mechanism of Antibody-Antigen Reaction
Biochem. biophys. Acta (1956), 20, 158
- 43) Nisselbaum, J. S., M. Schlamowitz and O. Bodansky:
Immunochemical Studies of Functionally Similar Enzymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1961), 94, 970
- 44) Nisselbaum, J. S. and O. Bodansky:
Immunochemical Studies of Human Lactic Dehydrogenases

- Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 930
- 45) Northrop, J. H.:
J. gen. Physiol. (1930), 13, 739, zit. b. 6)
- 46) Ouchterlony, Ö.:
Antigen-Antibody Reactions in Gels
Acta path. microbiol. scand. (1949), 26, 507
- 47) Ouchterlony, Ö.:
Antigen-Antibody Reactions in Gels
Arkiv Kemi (1949), 26 B, Nr. 14
- 48) Ouchterlony, Ö.:
Antigen-Antibody Reactions in Gels
Acta path. microbiol. scand. (1953), 32, 231
- 49) Pollock, M.R.:
Penicillinase - Antipenicillinase
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 988
- 50) Pressman, D. and G. Radzinski:
Increased Precipitability of Antibody as a Result of
Iodination
J. Immunol. (1962), 89, 367
- 51) Ramon, G.:
C. R. Acad. Sci. (1943), 217, 562, zit. b. 55)
- 52) Samuels, A.:
Immunoenzymology-Reaction Processes, Kinetics and the
Role of Conformational Alteration
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 858
- 53) Sartory, A. V. und J. Meyer:
C. R. Acad. Sci. (1947), 225, 79, zit. b. 55)
- 54) Scheidegger, J. J.:
Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse
Int. Arch. Allergy (1955), 7, 103
- 55) Schmidt, H.:
Fortschritte der Serologie, Dietrich & Steinkopff,
Darmstadt 1955
- 56) Schwick, G.:
Technik der Immuno-Elektrophorese
Lab.-Bl. (1958), 8. Jahrgang, 1, 11
- 57) Seastone, C. V. and R. M. Herriott:
Immunological Studies on Pepsin and Pepsinogen
J. gen. Physiol. (1937), 20, 797

- 58) Siekevitz, P.:
Reactions of Ribosomal-Bound Enzyme with its Antibody:
An Exercise
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 773
- 59) Smolens, J. and M. G. Sevag:
The Antigenicity of d-Ribonuclease; the Inhibition of
the Enzyme by its Homologous Immune Serum
J. gen. Physiol. (1943), 26, 11
- 60) Stern, L und F. Batelli:
Antikatalase, in: Oppenheimer, K.: Die Fermente und ihre
Wirkungen, Leipzig 1929, 5th edit., 1390
- 61) Sumner, J. B.:
Ergebn. Enzymforsch. (1937), 6, 201, zit. b. 1)
- 62) Suskind, S. R., M. L. Wickham and M. Carsiotis:
Antienzymes in Immunogenetic Studies
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 1107
- 63) Ultmann, J. E. and P. Feigelson:
The Interaction between Xanthine Oxidase and its Antibody,
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 724
- 64) Uriel, J.:
Characterization of Enzymes in Specific Immune-Precipitates,
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 956
- 65) Van Vunakis, H. and L. Levine:
Structural Studies on Pepsinogen and Pepsin: An Immunological
Approach
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 735
- 66) Webber, R. V. and J. W. Williams:
The Use of Statistical Theory in the Study of the Precipitin
Reaction
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 643
- 67) Williams, C. A., jr. and P. Grabar:
Immunoelectrophoretic Studies on Serum Proteins
J. Immunol. (1955), 74, 158
- 68) Wormall, A., G. E. Francis and W. Mulligan:
Labeling of Proteins with Iodine-131, Sulphur-35 and
Phosphorus-35
Nature (1951), 167, 748
- 69) Wust, C. J.:
Interference with Antibody Neutralization by Coenzyme
and Reducing Agents
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 849

70) Yanofsky, C.:

Antibodies to the Two Protein Components of Escherichia
Coli Tryptophan Synthetase
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103.II, 1067

71) Zamecnik, P. C. and F. Lipmann:

A Study of the Competition of Lecithin and Antitoxin
for Clostridium Welchii Lecithinase
J. exp. Med. (1947), 85, 395

Herrn Professor Dr. med. N. Lang möchte ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit herzlich danken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. F. Hartmann für die Möglichkeit, an seiner Klinik arbeiten zu dürfen.

Lebenslauf =====

Am 4. Januar 1936 wurde ich als drittes Kind des Zollsekretärs Richard Hoeffgen und seiner Ehefrau Klara, geborene Stenzel, in Heinersdorf Kreis Neiße (Schlesien) geboren. 1940 verzogen wir nach Kattowitz (O/S.), wo ich von September 1942 bis Dezember 1944 die Volksschule besuchte. Im Januar 1945 flüchteten wir nach Münsterberg Kreis Frankenstein in Niederschlesien und blieben dort noch bis August 1947. Dann wurden wir vertrieben und gelangten nach Ditzfurt Kreis Quedlinburg (SBZ), wo ich weiter die Volksschule besuchte. 1950 wurde ich aus der 8. Klasse entlassen und ging anschließend in die Oberschule in Quedlinburg. Im März 1953 flüchteten wir nach Westdeutschland. Wir kamen zunächst nach Bochum. Aus finanziellen Gründen konnte ich hier jedoch den Schulbesuch nicht fortsetzen. Ich lernte daher Stenographie und Maschinenschreiben und war von November 1953 bis August 1955 in einem Büro tätig.

Inzwischen hatte ich mich um den Abschluß meiner Schulbildung bemüht. Im September 1955 wurde ich durch das Schulkollegium in Münster in das Söderblom-Gymnasium in Espelkamp-Mittwald eingewiesen, wo ich im Februar 1958 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommer 1958 begann ich mein Medizinstudium an der Universität Göttingen, wo ich auch die naturwissenschaftliche und ärztliche Vorprüfung ablegte. Danach studierte ich je ein Semester in Bonn und Wien. Vom Wintersemester 1961/62 an studierte ich in Marburg. Im Februar 1964 bestand ich hier das medizinische Staatsexamen. Inzwischen war ich vier Monate als Medizinalassistentin an der hiesigen Universitäts-Hautklinik tätig.

Meine akademischen Lehrer waren:
=====

in Göttingen die Herren Professoren und Dozenten:

Bachmann, Becker, Blechschmidt, Brockmann,
Buckel, Deuticke, Flammersfeld, Glemser, Graumann, Gruber, Heberer, Henatsch, Hilsch, Hinrichsen, Hollmann, Kramer, Mannkopff, Neumann, Piepho, Pirson, Thiele;

in Bonn die Herren Professoren und Dozenten:

Bayer, Böhm, v. Eiff, Göppinger, Hamperl, Heymer, Janker, Korth, Lange, Mundt, Penitschka, Puck, Schaede, Tünnerhoff, Vorlaender;

in Wien die Herren Professoren und Dozenten:

Antoine, Fellingner, Kundratitz, Kunz, Moritsch, Obiditsch-Mayer, Salem, Ullick, Zischka-Konorsa;

in Marburg die Herren Professoren und Dozenten:

Beckmann, Berendes, Bock, Braun-Falco, Exner, Förster, Gedigk, Gerok, Groß, Hamm, Hartmann, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob, Kottmeyer, Lang, Linneweh, Lübbers, v. Manger-König, Marx, Müller, Neubauer, Niessing, Nieth, Rodenhäuser, Schadewaldt, Schmid, Schölmerich, Schrappe, Schwaiger, Siegert, Siess, Stein, Straub, Streicher, Wegerle, Würterle.

